Überreicht vom Verfasser

SONDERDRUCK AUS:

Jahrbuch für Morphologie und mikroskopische Anatomie. Zweite Abteilung

ZEITSCHRIFT FÜR MIKROSKOPISCH-ANATOMISCHE FORSCHUNG

BAND 48
HEFT 1

E. Tonutti

Die Vitamin-C-Darstellung im Gewebe und ihre Bedeutung zur funktionellen Analyse von Histosystemen

Eingereicht bei der Medizinischen Fakultät der Universität Breslau zur Erlangung der Würde eines Dr. med. habil.

1940
AKADEMISCHE VERLAGSGESELLSCHAFT M. B. H.
LEIPZIG

Inhalt.

Seite

E. Tonutti, Die Vitamin-C-Darstellung im Gewebe und ihre Bedeutung zur funktionellen Analyse von Histosystemen. Mit 28 Textabbildungen 1

Erich Hintzsche, Über Beziehungen zwischen Placentarbau, Urniere und Allantois (nach Untersuchungen an Microcebus murinus und an Centetidae). Mit 10 Textabbildungen (22 Einzelbildern) 54

Hans Kreht, Die markhaltigen Fasersysteme im Gehirn der Anuren und Urodelen und ihre Myelogenie; zugleich ein kritischer Beitrag zu den FLECHSIGschen myelogenetischen Grundgesetzen. I. Einleitung und Medulla oblongata. Mit Textabbildungen 1—22 108

P. G. Seeger, Vergleichende mikrochemische Untersuchungen über den Vitamingehalt von normalen Exsudatzellen und den Tumorzellen des EHRLICHschen Ascitescarcinoms der Maus. Der Vitamin-B_1-Gehalt. Mit 15 Abbildungen auf Tafel 1 181

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Neue Bestimmungen für Honorare und Sonderdrucke.

„Die Zeitschrift für Mikroskopisch-Anatomische Forschung" erscheint in einzelnen Heften. Mit etwa 40 Bogen ist ein Band abgeschlossen.

In die „Zeitschrift für Mikroskopisch-Anatomische Forschung" werden Arbeiten aus dem Gebiete der Gewebelehre und Entwicklungsgeschichte aufgenommen, deren Ergebnisse anderweitig noch nicht veröffentlicht sind. Die Arbeiten müssen vollkommen druckfertig, wenn möglich in Schreibmaschinenschrift abgeliefert werden. Die Zahl der Abbildungen soll auf das unbedingt nötige Maß eingeschränkt werden. Die Abbildungen sind auf besonderen Blättern beizufügen. Die Erklärungen dürfen nicht auf die Abbildungen selbst geschrieben, sondern müssen auf einem besonderen Blatt zusammengestellt werden. Der Verlag hat die Kosten der verschiedenen Arten der Wiedergabe von Abbildungen zusammengestellt. Die betreffende Druckschrift steht den Herren Mitarbeitern kostenlos zur Verfügung.

In den Arbeiten sind Ausführungen über früher erschienene Mitteilungen so viel wie möglich einzuschränken, sie werden, ebenso wie die Angaben über Untersuchungsarten usw., in Kleindruck gesetzt.

Die Herren Mitarbeiter werden gebeten, in ihren Arbeiten die neuen anatomischen Namen (J. N. A.) zu verwenden.

Die Herren Mitarbeiter erhalten 40 Sonderabzüge kostenlos. Gegen Erstattung der Verlagskosten können weitere 160 Sonderabzüge bezogen werden. Werden noch mehr Sonderabzüge gewünscht, so muß der Bogenpreis des betreffenden Heftes berechnet werden. Herausgeber und Verlag bitten dringend, nur die unbedingt nötige Zahl von Sonderabzügen zu bestellen.

Der Verlag stellt außerdem den Herren Mitarbeitern einen Betrag von 20 RM für einen 16seitigen Druckbogen zur Verfügung, bis zu einem Höchstbetrage von 60 RM für eine Arbeit, vorausgesetzt, daß keine ungewöhnlichen Anforderungen hinsichtlich der Abbildungen gestellt werden. Den Umfang von 3 Druckbogen sollen die Arbeiten im allgemeinen nicht überschreiten.

Wir machen ausdrücklich darauf aufmerksam, daß Korrekturkosten nur in Höhe von 10% der Satzkosten übernommen werden. Entstehen höhere Kosten, so müssen sie von den Herren Mitarbeitern getragen werden.

Für Doktorarbeiten sind besondere Vereinbarungen mit dem Verlag zu treffen.

Der Herausgeber:

Prof. Dr. med. et phil. **H. STIEVE, Berlin NW7,** Luisenstr. 56, Anatomie

Der Verlag:

AKADEMISCHE VERLAGSGESELLSCHAFT M. B. H.

LEIPZIG C 1, Sternwartenstraße 8

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Überreicht vom Verfasser

Sonderdruck aus
„Zeitschrift für mikroskopisch-anatomische Forschung". 48, 1—53. 1940.
Akademische Verlagsgesellschaft m. b. H. in Leipzig.

Aus dem Anatomischen Institut der Universität Breslau.
Direktor: Prof. Dr. W. Blotevogel.

H. VON EGGELING nachträglich zum 70. Geburtstag gewidmet.

Die Vitamin-C-Darstellung im Gewebe und ihre Bedeutung zur funktionellen Analyse von Histosystemen.

Von

E. Tonutti.

Mit 28 Textabbildungen.

(Eingegangen am 22. Februar 1940.)

Die Ergebnisse der Vitaminforschung der letzten Jahre haben gezeigt, daß mehrere wichtige Vitamine Teilstücke von Fermenten darstellen, denen grundlegende Bedeutung für den regulären Ablauf intermediärer Stoffwechselvorgänge zukommt. Es zeigte sich damit, daß gewisse Vitaminmoleküle für ganz allgemeine und primitive Protoplasmafunktionen von entscheidendem Einfluß sind.

Hier sei das Vitamin B_2, das Laktoflavin, erwähnt, das, verestert an Phosphorsäure und gebunden an einen Eiweißträger, das gelbe Atmungsferment der Zelle darstellt. Das Vitamin B_1 erwies sich als Coferment der Carboxylase und ist von wesentlichem Einfluß auf den geregelten Ablauf des Kohlehydratstoffwechsels der Zelle. Diese Ergebnisse der biochemischen Forschung haben dazu veranlaßt, die Vitamine in die Gruppe der biologischen Stoffwechselkatalysatoren einzureihen. In der Tat läßt sich beim Vitamin B_1 zeigen, daß seine biologische Wirkung, und zwar auch seine Heilwirkung letzten Endes auf seine nach dem Umbau zum Holoferment erfolgte Katalysatorennatur zurückzuführen ist. Das Vitamin B_1 kann nämlich seinen Heileffekt auf die B_1-Mangelerscheinungen nur dann ausüben, wenn gleichzeitiger Kohlehydratumsatz im Gange ist (TONUTTI und WALLRAFF). Verabreicht man bei ausgesprochener Beriberi Vitamin B_1 ohne gleichzeitige Traubenzuckergabe, so

tritt keine Heilung ein, desgleichen nicht, wenn Vitamin B_1 zusammen mit Traubenzucker und Insulin gegeben wird, da dann das Insulin das vorhandene Kohlehydrat in Beschlag nimmt. Das hat praktisch zur Folge, daß trotz Überschwemmung des Organismus mit dem Mangelfaktor die Mangelkrankheit weiterbesteht, wenn das Vitamin B_1 seinen regularisierenden Einfluß auf den Kohlehydratstoffwechsel nicht ausüben kann. Das Vitamin B_1 kann also wohl fördernd und regularisierend auf an sich gegebene Funktionen einwirken, es vermag aber nicht auslösend für diese Funktionen zu wirken. Sicherlich lassen sich ähnlich instruktive Beispiele katalytischer Wirksamkeit auch noch für andere Vitamine erbringen.

Mit der Auffassung der Vitamine als Stoffwechselkatalysatoren eng verknüpft ist das Problem der Vitaminspeicherung im Organismus. Der Wirkungsbereich der Vitamine erstreckt sich bekanntlich auf einen Großteil der wichtigsten für den Bestand des Lebens unerläßlichen Zellfunktionen, und es ist daher erforderlich, für die Zellarbeit momentan die notwendigen Wirkstoffe zur Verfügung zu haben. Während Fermente und Hormone im Augenblick des Bedarfs sezerniert werden oder zum mindesten aus Speicherzellen in Form der aktiven Substanzen ausgeschüttet werden können, ist der Organismus bezüglich der Vitaminversorgung auf die Außenzufuhr angewiesen. Zum mindesten muß aber ein gewisser Augenblicksbedarf auch unabhängig von der Nahrungszufuhr dem Körper zur Verfügung stehen, wobei eine derartige Speicherung sowohl in besonderen Organen als auch an bestimmten Zellstrukturen für die Einzelzelle selbst in Erwägung zu ziehen ist. Naturgemäß tritt die Frage der Vitaminspeicherung dann besonders in den Vordergrund, wenn der Vitaminbedarf ein erhebliches Ausmaß erreicht, wie das beim Vitamin C der Fall ist, von dem als Tagesbedarf etwa 50 mg angegeben werden. Das hat zur Folge, daß Mangelerscheinungen bei aussetzender Vitamin-C-Zufuhr sich besonders rasch bemerkbar machen. Gerade die Speicherungsmöglichkeiten für dieses Vitamin besitzen daher ein besonderes Interesse.

Das Studium des Vitaminstoffwechsels erstreckt sich bisher auf die Untersuchung der Ausscheidungsverhältnisse, auf die Bestimmung der Konzentration in einzelnen Körperflüssigkeiten und auf die chemische und biologische Ermittlung des Gesamtgehaltes einzelner Organe. Während die Untersuchung der Ausscheidungsverhältnisse vor allem beim Vitamin C fruchtbare Ergebnisse zeitigte, haben die chemische und biologische Bestimmung von Vitaminen in Organen keinen wesentlichen Einblick in die Wirkungsweise der Vitamine gegeben. Sie ließen vor allem natürlich nichts aussagen über den Vitaminstoffwechsel der einzelnen Zelle und über Vitaminbeladung der Zelle im Zusammenhange mit funktionellen Belastungen derselben. Diese Fragen sind mit Klarheit nur zu lösen durch den Nachweis der Vitamine im Protoplasma selbst. Bei den geringen Konzentrationen, die die Vitamine fast durchweg in den einzelnen Organen aufweisen, könnte dieser Weg zunächst aussichtslos erscheinen. Aber infolge der, wie oben bereits gesagt wurde, schon aus theoretischen Gründen zu fordernden Vitaminspeicherung, ist die Möglichkeit gegeben, daß die Vitamine in Form von Konzentraten in bestimmten Strukturen des Plasmas verankert sind, die dann eben doch in der Lage sind, mikroskopisch erfaßbare Reaktionen zu geben. Gicklhorn weist in ähnlichem Zusammenhange über den histochemischen Nachweis anderer Substanzen darauf hin, daß die für homogene Medien

im Schrifttum normierten Empfindlichkeits- und Erfassungsgrenzen keinerlei Maßstab für die Reaktionen im strukturierten Substrat darstellen können, da die meisten Substanzen durchweg in den Histosystemen nicht in diffuser, völlig gleichartiger Verteilung vorliegen, sondern meist irgendwie »geformt«, an ein bestimmtes Substrat gebunden und dort lokalisiert sind. Timm hat diese Verhältnisse für den Eisennachweis sehr gut illustriert. Er konnte zeigen, daß die mikrochemische Erfassungsgrenze des Eisens durch die Berlinerblaureaktion bei 0,002 mg liegt. In der Histochemie aber liegt die Erfassungsgrenze dafür bei $2{,}5 \times 10^{-7}$ mg, mithin ist die histochemische Eisenreaktion etwa 10000 mal empfindlicher als die mikrochemische Bestimmung im Mikrotropfen. Die Möglichkeit des direkten mikroskopischen Vitaminnachweises ist deshalb trotz des relativ geringen Gesamtgehaltes der meisten Organe durchaus gegeben, sofern sie für mikroskopische Beobachtung geeignete und stabile Reaktionen geben.

Für die fettlöslichen Vitamine A und D konnte ich früher auf indirektem Wege einen Zusammenhang mit den Plastosomen, Dauerorganellen jeder lebenden Zelle, als sehr wahrscheinlich aufzeigen. Dieses Untersuchungsergebnis konnte inzwischen für das Vitamin A durch amerikanische Autoren bestätigt werden, die durch eine besondere Zentrifugiermethode Plastosomenmaterial aus Leberzellen isoliert gewinnen konnten und mit Hilfe der Antimontrichlorid-Reaktion deren hohen Vitamin-A-Gehalt nachwiesen. Diese damit sehr wahrscheinliche Bindung des Vitamin A an die Plastosomen erlaubt aber noch nicht, mit Hilfe des Plastosomennachweises sichere Rückschlüsse auf den Vitamin-A-Stoffwechsel der Einzelzelle zu ziehen, da die Plastosomen komplexe Gebilde darstellen, die als Grundlage Phosphorlipoide und Eiweißsbstanzen enthalten und wahrscheinlich Träger einer ganzen Reihe wichtiger Stoffwechselkatalysatoren der Zelle darstellen. Ihr charakteristisches Verhalten bei einer Reihe wesentlicher Zellarbeiten, wie insbesondere der Sekretbereitung, spricht ganz in diesem Sinne.

Nur für das Vitamin C ist mit einer durch zahlreiche Versuche einwandfrei gesicherten histochemischen Reaktion die Möglichkeit gegeben, die oben genannten Probleme, wie Vitamin-Stoffwechsel der Einzelzelle unter verschiedenen Bedingungen und Angriffspunkt des Vitamins im Protoplasma zu untersuchen. Es hat sich aber gezeigt, daß auf Grund von sichergestellten Zusammenhängen zwischen Zellarbeit und Vitamin-C-Aufladung sich die Methodik des histochemischen Vitamin-C-Nachweises als allgemeine histologische Arbeitsmethode verwenden läßt, die über den Rahmen der Vitamin-C-Forschung hinausgeht und sich zur funktionellen Analyse histophysiologischer Systeme eignet. Die üblichen histologischen Methoden gestatten nur in geringem Maße einen Einblick in die Arbeitsbeanspruchung und den Arbeitseinsatz von Zellen, sondern vermögen im wesentlichen nur die Grundlage zu einer statischen Betrachtungsweise zu geben. Während man dieser einseitigen Orientierung durch die Auswertung histologischer Reihenbilder verschiedener Funktionsphasen desselben Organs zu entgehen suchte und dabei Kerngröße, Zellgröße, Sekretkörner und gelegentlich auch Veränderungen der Zellorganellen, der Vitalfärbbarkeit u. dgl. der Auswertung zugrunde legte, erlaubt der Ausfall der histochemischen Vitamin-C-Reaktion einen unmittelbaren Einblick in die Arbeitstätigkeit der Einzelzelle und, was vor allem wichtig ist, eine Erkennung ihres Arbeitseinsatzes im Rahmen gewisser Zellsysteme. Daneben aber gibt sie zugleich die Möglichkeit,

an Hand der leicht auffindbaren Ascorbinsäure Fragen der allgemeinen Zellphysiologie, wie Permeabilität, Resorption, Exkretion, Konstanterhaltung der Protoplasmaheterogenität u. dgl., zu prüfen.

Ziel der vorliegenden Untersuchung ist über die Grundlagen der Vitamin-C-Darstellung im Gewebe zu berichten und ein Gesamtbild des mit ihrer Hilfe bisher gewonnenen Einblicks in den Vitamin-C-Stoffwechsel der tierischen Zelle zu geben. An Hand einiger Beispiele ergibt sich dabei zugleich Gelegenheit, die Anwendung der Vitamin-C-Darstellung als histophysiologische Arbeitsmethode zu zeigen. Die Arbeit stellt einen Querschnitt durch die von mir bzw. unter meiner Leitung ausgeführten Arbeiten über das Vitamin-C-Problem dar, wobei das gesamte Versuchsmaterial zusammenfassend nach einheitlichem Gesichtspunkt dargestellt wurde. Da die Versuche zum größten Teil bereits im Rahmen spezieller Fragestellungen veröffentlicht sind, ist auf eine ausführliche Darlegung von Versuchsanordnungen und Einzelbefunden grundsätzlich verzichtet und nur das für die Entwicklung des Gesamtbildes erforderliche jeweilige Hauptergebnis der einzelnen Versuche übernommen worden.

Untersuchungsarten.

Die Reaktion zum histochemischen Nachweis des Vitamins C gründet sich auf eine Beobachtung von Szent-Györgyis, der bemerkte, daß frisches Nebennierenrindengewebe sich mit Silbernitrat augenblicklich schwärzt. Giroud und Leblond bauten die Reaktion daraufhin zu einer für histologische Zwecke brauchbaren Methode aus. Als wesentlich erwies sich die Verwendung von $AgNO_3$ in saurer Lösung, da nur dieses von ascorbinsäurefreien Geweben nicht reduziert werden kann. Der Gang der Reaktion ist kurz folgender: Die zu untersuchenden lebensfrischen Organe werden zunächst mit isotonischer Lävuloselösung durchgespült, um etwa störendes Kochsalz aus der Blutbahn zu entfernen. Daraufhin wird das Gewebe durch die Blutbahn mit 10% Silbernitratlösung, die durch Eisessigzusatz auf ein p_H von 3—4 gebracht wurde, aufgefüllt. Die hohe Silbernitratkonzentration gewährleistet zugleich eine gute Fixierung der Gewebe. Nach 15 Minuten Einwirkungsdauer wird mit destilliertem Wasser durchspült, womit der Gang der Reaktion bereits abgeschlossen ist. Um Nachdunkeln der Präparate durch im Gewebe verbliebene Silbernitratreste zu verhüten, kann eine 3%ige Natriumthiosulfatlösung nachgeschickt werden, die nach 15—30 Minuten wieder sorgfältig mit H_2O ausgewaschen wird. Da sich die Füllung der Blutbahn mit $AgNO_3$ oft als nicht ausreichend erweist, um größere gefäßlose Gewebsbezirke ausgiebig mit $AgNO_3$ zu durchtränken (z. B. pneumonische Herde, Tuberkel, Graafsche Follikel u. dgl.), bevorzuge ich das direkte Einlegen kleiner von Fett und Kapsel befreiter Organstückchen in die aufeinanderfolgende Reihe der Reagenzien. Nach gründlichem Wässern in mehrmals zu wechselndem Wasser werden die Präparate in der üblichen Weise entwässert und in Paraffin eingebettet. Die Schnittdicke soll, um Einzelheiten gut erkennen zu lassen, nicht stärker als 5—8 μ sein. Für

die Darstellung des Kernes und des Protoplasmas eignen sich besonders Kernechtrot und Lichtgrün, nach den bekannten Vorschriften. Die Durchführung der eigentlichen Reaktion erfolgt bei völliger Dunkelheit und bei Zimmertemperatur.

Für einzelne Gewebe, und zwar besonders embryonale (Knochen- und Muskelentwicklung, Placenta), hat sich die Verwendung einer 1%igen Goldchloridlösung (Ansäuerung wie beim $AgNO_3$!) als vorteilhaft erwiesen, da das Silbernitrat bei diesen H_2O- und eiweißreichen Geweben zur Verschorfung führt und dann nicht weiter in die Tiefe dringen kann. Die Verwendung von Goldchlorid erlaubt dabei zugleich die Durchführung einer mäßigen Entkalkung der Präparate durch Trichloressigsäure. Das Fixierungsergebnis ist bei der Verwendung von Goldchlorid in der geringen Konzentration schlechter als bei Gebrauch der 10%igen Silbernitratlösung, weshalb das Goldchlorid nur für die genannten Sonderfälle angezeigt erscheint. Die weitere Behandlung der Präparate gleicht im übrigen, unter Wegfall der Thiosulfatbehandlung, völlig dem Verfahren unter Silbernitratverwendung.

Mit den in der Histologie so zahlreichen und in den verschiedensten Modifikationen gebräuchlichen »Versilberungsmethoden« hat die Vitamin-C-Reaktion nichts zu tun. Einmal wird bei allen diesen Methoden das Gewebe vorher fixiert, und zwar gewöhnlich mit Formalin. Da der Fixierungsprozeß sich oft sogar über Tage erstreckt, ist die Ascorbinsäure bis zur Anwendung des Silbernitrats längst herausgelöst oder zerstört. Bei allen diesen Verfahren gelangen im übrigen niemals saure $AgNO_3$-Lösungen zur Verwendung, sondern meist sogar alkalische Lösungen. Mit diesen wird das fixierte Gewebe längere Zeit imprägniert und dann das an bestimmten Strukturen verankerte Silbersalz durch Einlegen der Gewebe in Hydrochinonlösung oder dgl. reduziert. Auch die Methoden der Golgi-Apparatdarstellung am fixierten Objekt nach Cajal, da Fano und deren Modifikationen gleichen diesem Prinzip der sekundären Reduktion vollständig. Demgegenüber wird bei der sogenannten Vitamin-C-Reaktion die saure $AgNO_3$-Lösung durch einen im Gewebe liegenden Faktor am lebensfrischen Präparat reduziert. Die Berechtigung, diesen Reduktionsfaktor mit der Ascorbinsäure zu identifizieren, wird sich aus dem Folgenden ergeben.

Zur Spezifität des histochemischen Vitamin-C-Nachweises.

Für den Spezifitätsbeweis der Reaktion ist nun der Nachweis zu erbringen, daß in der Tat nur die Ascorbinsäure in der Lage ist, $AgNO_3$-Lösung mit dem genannten sauren p_H-Wert und unter den angegebenen Bedingungen zu reduzieren. Giroud und Leblond untersuchten in vitro eine große Anzahl der im Organismus vorkommenden reduzierenden Substanzen in dieser Hinsicht und fanden, daß keine in der Lage ist, die saure $AgNO_3$-Lösung zu reduzieren, außer gewissen Pigmentgranula der Haut, die aber als Störfaktor infolge ihrer leichten Nachweisbarkeit im alkoholfixierten Kontrollpräparat ausscheiden. Dieses Versuchsergebnis konnte von Bourne und mir bestätigt werden. Auch die angesäuerte Goldchloridlösung kann beispielsweise von Adrenalin, Glutathion, Cystin u. dgl. nicht zu metallischem Gold reduziert werden, während die Ascorbinsäure dies in vitro schlagartig tut.

Aber auch durch die Untersuchung der Gewebe selbst ergaben sich wertvolle Hinweise, daß durch sonstige Methoden sehr wohl histologisch erfaßbare

reduzierende Substanzen von keinem Einfluß auf das Silbernitratreagens sind. So zeigt das Nebennierenmark keine Reduktionsfähigkeit gegenüber der sauren Silbernitratlösung, wenn beispielsweise sehr wohl die gleichfalls durch einen Reduktionsvorgang entstehenden chrombraunen Granula vorhanden sind. So kann im nicht gereizten Nebennierenmark Adrenalin bzw. Adrenalinvorstufen durch ammoniakalische Silberlösung, durch Reduktion von Osmiumsäure u. dgl. nachgewiesen werden. Die entstehenden Osmiumgranula sind gegenüber Fettlösungsmitteln resistent und können somit auf die reduzierenden Adrenalingranula bezogen werden. Gerade das negative Verhalten der sauren $AgNO_3$-Lösung gegenüber dem im Ruhestand reichliche reduzierende Substanzen enthaltenden Nebennierenmark erscheint viel wesentlicher als der negative Ausfall der Reaktion mit Adrenalin in vitro, weil es zeigt, daß die reduzierenden Adrenalingranula in ihrem natürlichen Milieu nicht in der Lage sind, auf die saure $AgNO_3$-Lösung einzuwirken. Für das bei den titrimetrischen Vitamin-C-Bestimmungen in Organen so sehr störende Glutathion läßt sich ein ganz ähnliches Verhalten zeigen. Ries, der in den Eiern und Furchungsstadien von verschiedenen marinen Lebewesen histochemisch Vitamin C, Glutathion u. dgl. untersuchte, fand, daß es nahe verwandte Arten gibt, von denen die einen eine sehr stark positive Vitamin-C-Reaktion, aber keine Sulfhydrilreaktion ergaben. Andere ganz nahe verwandte Arten zeigen ein umgekehrtes Verhalten, und wiederum andere ergaben für beide Substanzen positive Reaktion. Daraus ist ersichtlich, daß einmal Glutathion und Vitamin C in derselben Zelle getrennt mit besonderen Methoden erfaßbar sind und weiterhin glutathionreiche Zellen ohne Einfluß auf das Vitamin-C-Reagens sind. Das Glutathion weist also auch innerhalb der Zelle keine Reduktionsfähigkeit für saure $AgNO_3$-Lösung auf. Klar ergibt sich dies auch an Versuchen mit Speicheldrüsengewebe, das im Ruhezustand eine sehr starke Glutathionreaktion gibt, aber saure Silbernitratlösung nicht zu reduzieren vermag.

Eine weitere Beweiskette der Spezifität, worauf auch bereits Giroud und Leblond sowie Bourne hinwiesen, ergibt sich aus folgendem: Der Ausfall der histochemischen Vitamin-C-Reaktion stimmt durchaus überein mit den Vitamin-C-Gehaltsbestimmungen, die sich bei der chemischen und titrimetrischen Ermittlung und auch bei der biologischen Auswertung, die den zuverlässigsten Nachweis der Ascorbinsäure darstellt, für die einzelnen Organe ergaben. Es sei hier nur verwiesen auf das übereinstimmende Ergebnis aller Nachweismethoden bei der Nebennierenrinde, dem Corpus luteum, der Hypophyse und den Hodenzwischenzellen. Neuweiler beispielsweise fand in der Placenta den Vitamin-C-Gehalt nach der mütterlichen Seite zunehmend, gemeinsam mit Plate konnte ich zeigen, daß histochemisch in der Tat in der Decidua die reichlichste und konstanteste Vitamin-C-Beladung in der Placenta zu finden ist. Histochemisch ergab sich, daß nur die eben reifenden Follikel im Ovarium in ihren Theca-interna-Schichten und in der Eizelle Vitamin-C-Gehalt aufwiesen. Ley fand auf titrimetrischem Wege gleichfalls den höchsten Vitamin-C-Gehalt in isoliert untersuchten reifenden Follikeln.

Noch wesentlicher erscheint aber die Tatsache, daß in Organen, die normalerweise z. B. beim Meerschweinchen sich als völlig frei von histochemisch nachweisbarem Vitamin C zeigen, wie z. B. Darmepithel, Epithelien der Niere, schon wenige Minuten nach Verabreichung synthetischer Ascorbinsäure eine massive

Beladung der genannten Zellen eintritt. So ist Vitamin C kurze Zeit nach peroraler Gabe in den Saumzellen des Dünndarms auf dem Resorptionswege und ebenso in den Hauptstückzellen der Niere wenige Minuten nach subcutaner Injektion mit der Silbernitratreaktion nachweisbar. Dabei wurde kürzlich von Giroud und Leblond auch in Reihen- und Parallelversuchen gezeigt, daß Vitamin-C-Beladung der Hauptstückzellen und titrimetrisch bestimmte Ascorbinsäurekonzentration in Niere und Harn bei Ausscheidungsversuchen einander völlig parallel gehen. Alle drei Werte erreichen zur gleichen Zeit ihr Maximum und klingen gleichzeitig wieder ab. Auch in der menschlichen Placenta gelang es (Tonutti und Plate) durch Zufuhr von synthetischem Vitamin C, wenige Stunden vor der Geburt eine enorme, das sonst anzutreffende Ausmaß wesentlich übersteigende Vitamin-C-Beladung der Zellen zu erzielen.

Schließlich sei in diesem Zusammenhange schon vorwegnehmend gesagt, daß sich das mit Hilfe der genannten Reagenzien erfaßte Vitamin C stets an bestimmte Zellstrukturen gebunden erweist, so daß bei der Beurteilung des Reaktionsausfalls nicht irgendwelche vagen Niederschläge im Gewebe zur Diskussion stehen, sondern stets ein und dieselbe, aus der allgemeinen Histologie wohlbekannte Zellstruktur. Gerade dieses für das Vitamin C absolut charakteristische Verhalten, die Bindung an ein wohl definiertes, konstantes Plasmasubstrat schließt Fehldeutungen des Reaktionsausfalles bei cytologischer Sachkenntnis mit Sicherheit aus.

Das wesentlichste Beweismoment, das für die Spezifität der in Frage stehenden Reaktion angeführt werden kann, ist ihr völlig negativer Ausfall nach vitamin-C-freier Ernährung beim Meerschweinchen. Die Nebennierenrinde des Meerschweinchens ist schon nach 6—9 Tagen vitamin-C-freier Kost nicht mehr in der Lage saure $AgNO_3$-Lösung zu reduzieren. Dabei ist der Ausfall der Reaktion vollständig negativ, d. h. nicht ein Körnchen reduzierten Silbers ist mehr auffindbar. Das gleiche gilt für Hoden, Ovarium, Corpus luteum, Leber, lymphatisches Gewebe, Histiocyten, Alveolarphagocyten der Lunge, kurz, in allen bisher überprüften Fällen fiel die Reaktion im Skorbutzustande negativ aus. Gibt man aber Skorbuttieren wieder normale Kost oder zu Skorbutkost synthetisches Vitamin C, so fällt die Reaktion schon nach kurzer Zeit wieder positiv aus. In eindeutiger Weise ließ sich dieses Verhalten an ein und demselben Organismus zeigen, wobei der Hoden als Testobjekt diente. Dort findet sich in den Zwischenzellen bei normaler Ernährung reichlich und konstant Vitamin C. Ein Skorbuttier wurde nun halbseitig kastriert und mit dem entnommenen Hoden die Silbernitratreaktion angestellt. Sie fiel negativ aus. Dem Versuchstier wurde nun Vitamin C injiziert und der im Körper verbliebene Hoden am nächsten Tage untersucht. Die Zwischenzellen ergaben zu diesem Zeitpunkt wieder positive Reaktion. Der Versuch zeigt klar, daß die Fähigkeit der Zellen saure $AgNO_3$-Lösung zu reduzieren in der Tat auf der Anwesenheit von Ascorbinsäure beruht, so wie diese in vitro eine momentane Reduktion zu metallischem Silber bewirkt.

Der negative Ausfall der histochemischen Vitamin-C-Reaktion schon nach relativ kurzer vitamin-C-freier Ernährung braucht noch nicht die völlige Abwesenheit von Ascorbinsäure zu bedeuten. Gerade dieses frühzeitige Verschwinden der Reaktion beim Skorbut deutet vielmehr darauf hin, daß die Reaktion offenbar einen ziemlich hohen Schwellenwert besitzt, von dem an sie

positiv wird. Dieses Verhalten aber ermöglicht erst die weitgehende Anwendung der Vitamin-C-Reaktion für histophysiologische Fragestellungen, da, bedingt durch den hohen Schwellenwert, eben positiven Befunden auch absolut negative bei den verschiedenen Versuchsanordnungen einander gegenüberstehen. Dadurch erst wird es möglich, Verschiebungen im Vitamin-C-Haushalt der einzelnen Zellen und Organe genau zu erfassen, weil subjektive Beobachtungsfehler durch die leider in der Histologie viel gebrauchten Schätzungen mit oft vielfachen Abstufungen des Reaktionsausfalles unterbleiben können, die naturgemäß einer ernsthaften Kritik niemals standhalten können.

Die in vorstehendem gemachten Angaben mögen genügen, um von der Sicherheit und Eindeutigkeit des histochemischen Vitamin-C-Nachweises zu überzeugen. Selbst wenn die chemische Forschung aber noch einen ähnlichen Stoff im Organismus zutage fördern sollte, der gleich der Ascorbinsäure in der Lage ist, saure Silbernitratlösung unter den angegebenen Bedingungen zu reduzieren, so würde das die Brauchbarkeit der Reaktion nicht beeinträchtigen. Da die Reaktion im Skorbutzustand völlig negativ ausfällt, müßte diese Substanz einen der Ascorbinsäure parallelen Zyklus im Stoffwechselgeschehen der Zellen durchmachen, d. h. also auch verschwinden u. dgl. Da aber mit der histochemischen Auswertung keine zahlenmäßige Erfassung der Ascorbinsäure ermittelt werden, sondern nur grobe Verschiebungen im Vitamin-C-Haushalt der Zellen aufgedeckt werden können, so scheidet eine derartige Substanz als Störfaktor aus. Im Gefolge bestimmter Versuchsanordnungen neu auftretende »Vitamin-C-Beladungen« vorher unbeladener Zellen können im übrigen jeweils auf ihre wirkliche »Vitamin-C-Natur« durch Wiederholung des Versuches an Skorbuttieren geprüft werden.

Für die Auswertung der Reaktion selbst sei noch betont, daß das durch die Ascorbinsäurewirkung entstehende metallische Silber tiefschwarz erscheint und durch starke künstliche Lichtquellen im Mikroskop nicht durchleuchtet werden kann. Das entstandene metallische Silber scheint also in grober Form vorzuliegen, zeigt aber in sich selbst keine Strukturierung. Erfaßt wird durch die Reaktion naturgemäß nur die reduzierte Form der Ascorbinsäure. Vom Ascorbinsäure-Redoxsystem kann also nur diese eine Teilkomponente im Gewebe nachgewiesen werden. Es wird sich später zeigen lassen, daß die so erfaßte Ascorbinsäure in erster Linie, wenn nicht ausschließlich, für die Zellfunktion gespeichertes und deponiertes Vitamin C darstellt, nicht dagegen die gerade aktiv im Stoffwechsel der Zelle befindliche Ascorbinsäure.

Vitamin C und Protoplasma.

Als Ausgangspunkt der Darstellung sei die Nebennierenrindenzelle gewählt, die mit zu den vitamin-C-reichsten Zellen des Organismus gehört. In der Nebennierenrinde läßt sich das Vitamin C normalerweise in der Zona fasciculata und Zona reticularis nachweisen. Die Zellen der Zona glomerulosa zeigen jedoch gleichfalls häufig Beladung, jedoch in viel geringerem Ausmaß. Das Vitamin C ist dabei in den Zellen der Zona fasciculata in Form feiner Körnchen diffus im ganzen Proto-

plasma verteilt (Abb. 1). Die Körnchen sind von annähernd gleicher Größe und, wie sich leicht an mit Fettfarbstoffen nachgefärbten Gefrierschnitten zeigen läßt, in dem Grundplasma der Zellen, zwischen den für die Zona fasciculata charakteristischen Lipoidstoffen gelagert. Die Art der Vitamin-C-Körnchenverteilung erinnert an das Bild der Plastosomen, weshalb Giroud und Leblond auf Grund dieses Verhaltens glaubten, das Vitamin C sei intracellulär an die Plastosomen gebunden (»Aspect mitochondriale« der französischen Autoren).

Wie in der Einleitung schon erwähnt wurde, ließ sich aber zeigen, daß die Plastosomen mit den fettlöslichen Vitaminen A und D in enger Beziehung stehen. Die Plastosomen verschwinden beispielsweise im braunen Fettgewebe der weißen Maus vollständig bei vitamin-A- und D-freier Ernährung und treten wenige Stunden nach Zufuhr der fettlöslichen Vitamine wieder auf (Tonutti). Nach Untersuchungen von Hirt scheinen sie auch Beziehungen zum Vitamin B_2 zu haben, das fluorescenzmikroskopisch durch eine spezifische Veränderung der Trypaflavinfluorescenz nachweisbar ist. Hirt fand auf diese Weise ein sehr starkes Aufleuchten der Plastosomen der Froschleberzellen nach Injektion von Vitamin B_2 in die Pfortader. Bestätigt sich dies weiterhin, so erfährt die von mir früher ausgesprochene Auffassung, daß die Plastosomen im Mittelpunkt des Vitaminstoffwechsels der Zelle stehen, einen weiteren Ausbau. Für das Vitamin C aber hat sich die Auffassung der französischen Autoren, nämlich die Bindung an die Plastosomen, inzwischen als nicht zutreffend erwiesen, wie sich aus dem Folgenden ergeben wird.

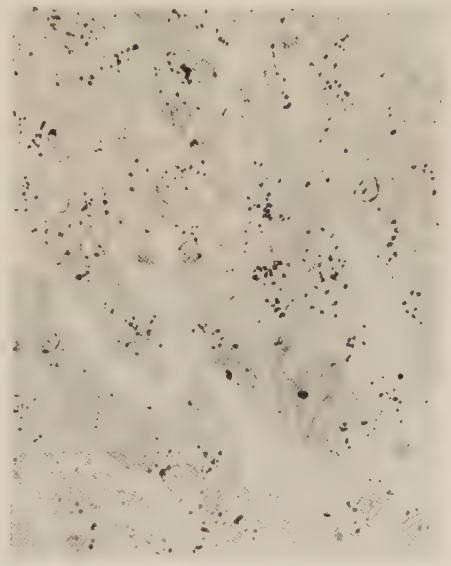


Abb. 1. Vitamin-C-Granula in Nebennierenrindenzellen. Kaninchen.

Es zeigt sich nämlich, daß die eben geschilderte granuläre und damit in gewissem Sinne plastosomenähnliche Vitamin-C-Verteilung keineswegs dauernd zu beobachten ist, obwohl sie beim Normaltier beispielsweise in den Nebennierenrindenzellen, dem Corpus-luteum-

Zellen, Hodenzwischenzellen und den chromophilen Elementen des Hypophysenvorderlappens den Regelbefund darstellt. Häufig kann man aber auch bei diesen Organen beobachten, daß in einzelnen Zellen ein Teil der Körnchen in der Nähe des Kernpols in einem besonders hellen und durchsichtigen Protoplasmabezirk, dem Golgi-Feld, liegen. In dieser Zone ist mit entsprechenden Methoden der sogenannte Gogli-Apparat oder das Endopegma (Kopsch) darstellbar. Diese Lagerung der Körnchen am Golgi-Feld beweist aber zunächst noch nichts über etwaige tiefere Zusammenhänge von Vitamin-C-Körnchen und Golgi-Apparat, da bekanntlich auch die Plastosomen gelegentlich bei bestimmten Funktionszuständen von Zellen an das Golgi-Feld heranwandern können.

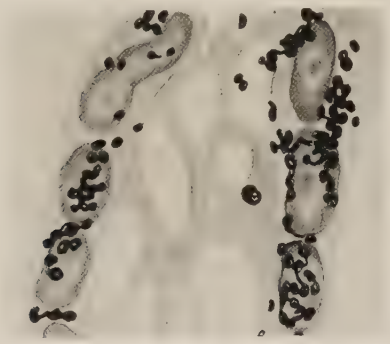


Abb. 2. Syncytium. Menschliche Placenta. Vitamin C am Golgi-Apparat.

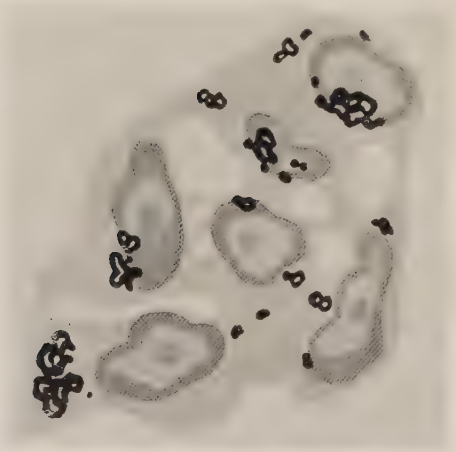


Abb. 3. Stromazellen. Menschliche Placenta. Vitamin C am Golgi-Apparat.

Beobachtungen an der menschlichen Placenta aber ergaben nun, daß bei reichlicher Vitamin-C-Versorgung der Mutter, sowohl im Syncytium wie in den Stromazellen der Placentarzotten bei Anwendung der Vitamin-C-Reaktion der Golgi-Apparat in seiner wohlbekannten Form zur Darstellung kommt. Wie die Abb. 2 und 3 zeigen, findet sich in solchen Fällen im Syncytium und in Stromazellen ein durch die Vitamin-C-Reaktion sichtbar gewordenes Netzwerk, das vollständig dem Bilde und der Lagerung nach dem Golgi-Apparat gleicht, wie er durch die in der Histologie sonst üblichen Methoden zur Darstellung gebracht wird. Damit ist der Nachweis erbracht, daß bei bloßer Zellpassage, wie dies hier für das Vitamin C von der mütterlichen nach der fötalen

Seite der Fall ist, der Weg des Durchtritts über den Golgi-Apparat erfolgt. Genau dasselbe konnte für die Saumzellen des Dünndarms nachgewiesen werden (Lampa). In den Saumzellen stellt der Golgi-Apparat ein längliches dreidimensionales Flechtwerk dar, das am apikalen Kernpol lagert. Läßt man nun Vitamin C resorbieren und untersucht nach kurzer Zeit mittels der Silbernitratreaktion den frischen Darm, so erhält man in den Saumzellen wiederum das Bild des Golgi-Apparates. Dabei sei betont, daß bei leerem Darm oder vitamin-C-freiem Futter keine Spur von Silbernitrat in den Saumzellen reduziert wird. Auch hier erfolgt also der Durchtritt des Vitamins durch das Plasma nicht auf diffusem Wege, sondern über den Golgi-Apparat und, wie damit gleich gesagt werden kann, unter aktiver Mitarbeit des Protoplasmas.

Wie ist nunmehr das obengenannte Bild der granulären Vitamin-C-Verteilung in der Nebennierenrinde im Corpus luteum u. dgl. zu erklären? Auf Grund der Beobachtung an Placenta und Darm war zu vermuten, daß die Ascorbinsäure primär über den Golgi-Apparat aufgenommen wird und die granuläre Verteilung einen sekundären Zustand darstellt. Der Nachweis hierzu ließ sich am Corpus luteum erbringen. Während die Corpus-luteum-Zelle hinsichtlich der Vitamin-C-Beladung ein mit der Nebennierenrindenzelle völlig übereinstimmendes Bild zeigt, sind die Mutterzellen der Granulosaluteinzellen, die Granulosazellen des Graafschen Follikels, völlig vitamin-C-frei. Die frühesten Entwicklungsstadien der Corpus-luteum-Zellen mußten daher über den Vorgang der Einströmungsphase der mit fortschreitender Reife auftretenden Vitamin-C-Beladung Aufschluß geben. Da beim Kaninchen bekanntlich mit dem Kohabitationsakt der Follikelsprung fast zeitlich zusammenfällt, war hier Gelegenheit gegeben, Gelbkörper genau bekannten Alters zu untersuchen. Schon an 48 Stunden alten Corpora lutea war die Vitamin-C-Beladung zu beobachten, und zwar nicht in einer über das ganze Plasma der Zellen verteilten Form, sondern als punktiertes Netzwerk in der Golgi-Zone innerhalb einer vakuolenartigen durchsichtigen, polar gelagerten Zone (Abb. 4).

Abb. 4. Corpus-luteum-Zelle aus einem 48 Stunden alten Gelbkörper des Kaninchens. Vitamin C am Golgi-Apparat innerhalb einer hellen Vakuole.

Ebenso eindeutig glückte der Nachweis des Vitamin-C-Einstroms über den Golgi-Apparat in die sich zur Luteinzelle umwandelnde

Granulosazelle, durch die Erzeugung von sogenannten Einschluß-Gelbkörpern mittels hoher Prolangaben. Die Abb. 5 zeigt das Follikelepithel eines unter Prolanwirkung stehenden Graafschen Follikels. Auch hier ist das Bild der Vitamin-C-Aufladung am Golgi-Apparat im Gegensatz zu der gleichmäßigen granulären Verteilung der ausgeprägten Corpus-luteum-Zelle deutlich erkenntlich. Es läßt sich hieraus also klar ablesen, daß die diffus-granuläre Anordnung ein sekundärer Zustand ist. Aber auch die Nebennierenrindenzelle läßt gleichlaufende Beobachtungen machen, wenn Nebennieren zur Untersuchung gelangen, die funktionellen Belastungen ausgesetzt sind. So ließ sich bei der Maus im Gefolge von Untersuchungen über Toxinwirkungen nach

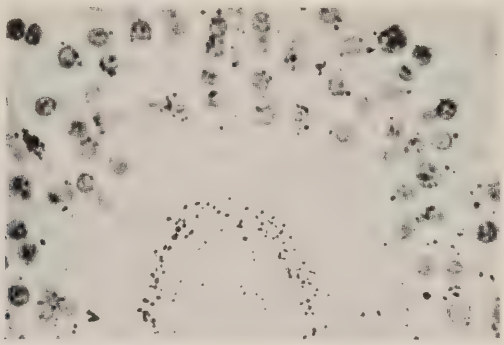


Abb. 5. Follikelepithel eines durch Prolan erzeugten »Einschluß-Gelbkörpers«.

Tetanustoxininjektion fast regelmäßig das Bild der Vitamin-C-Beladung am Golgi-Apparat nachweisen, im Gegensatz zu der sich normalerweise dort findenden granulär-diffusen Lagerung. Die Erscheinung ist vermutlich auf rege stattfindende Vitamin-C-Verschiebungen im Gehalt der einzelnen Zellen zurückzuführen. Auch die Lymphocyten, die im normalen Lymphknoten und im lymphatischen Gewebe des Magen-Darmkanals unbeladen gefunden werden, zeigen unter bestimmten Reizwirkungen Vitamin-C-Beladung, die wiederum das Bild des Golgi-Apparates ergibt, so wie es mit der Methode von da Fano darstellbar ist. Die Abb. 6 gibt bei stärkster Vergrößerung lymphocytäre Elemente aus dem Ileum des Meerschweinchens wieder. Jede einzelne Zelle zeigt den am Kernpol sitzenden Golgi-Apparat, an den also offenbar das Vitamin C gebunden ist. Golgi-Apparatbeladung und diffus-granuläre Vitamin-C-Beladung stellen auf Grund dieser Ergebnisse demnach Anfangs- und Endglied des histologisch faßbaren Ascorbinsäureeinstroms in der Zelle dar.

Wie vollzieht sich nun die Bildung der Vitamin-C-Granula? Die Entstehung der Granula ist an hochaktiven Zellelementen, bei denen offenbar ein sehr reger Vitamin-C-Anstrom erfolgt, im mikroskopischen

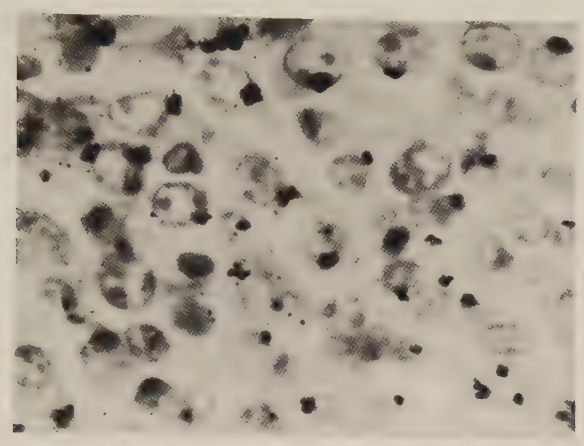


Abb. 6. Vitamin-C-Beladung am GOLGI-Apparat. Lymphocytäre Zellelemente aus einem Haufenfollikel des Ileums. Meerschweinchen. Diphtherietoxinvergiftung.

Bilde in zahlreichen Fällen unmittelbar ablesbar. In solchen Fällen zeigt sich nämlich, daß vom Vitamin-C-beladenen GOLGI-Apparat aus nach allen Seiten in das Protoplasma radiär, häufig in Form von Perlschnüren, Fortsätze reichen, von denen sich in der Peripherie einzelne Körnchen ablösen. Die Abb. 7 zeigt dieses Verhalten an einer aktivierten Nebennierenmarkzelle. Die Vitamin-C-Körnchen werden am GOLGI-Apparat gebildet und von hier aus in das Plasma abgestoßen. Dieser Vorgang ist außerordentlich häufig zu beobachten, und zwar in den verschiedensten Zellsorten. Ein besonders klares Beispiel gibt die Abb. 8 wieder (vgl. dazu auch Abb. 23). Hier handelt es sich um die Epitheloidzellen eines ganz jungen Tuberkels in der Nebennierenrinde des Kaninchens, in denen sich neben dem Vitamin C gleichzeitig Tuberkelbazillen darstellen ließen.

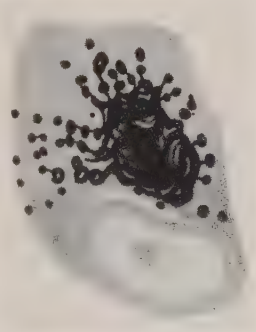


Abb. 7. Aktive Nebennierenmarkzelle. Vitamin-C-Emission am GOLGI-Apparat.

Fast alle Epitheloidzellen dieses nur aus wenigen Zellen bestehenden Tuberkels lassen deutlich das Bild der radiären Ausstrahlung der Vitamin-C-Granula vom GOLGI-Apparat erkennen. Auch an Alveolar-

phagocyten (Abb. 9), aktiven Histiocyten, aktivierten Reticulumzellen der Milz ist die zweckmäßig als Vitamin-C-Emission zu bezeichnende Erscheinung abzulesen. Sie ist mit größter Regelmäßigkeit immer wieder

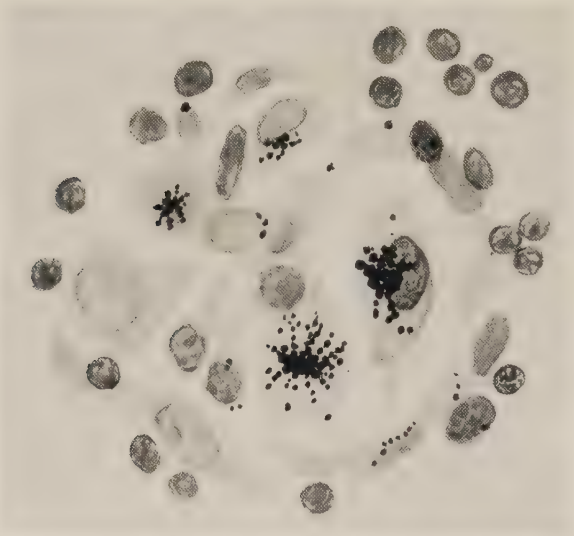


Abb. 8. Ganz junger Tuberkel in der Nebennierenrinde eines tuberkulose-infizierten Kaninchens. Vitamin-C-Emission in fast allen Epitheloidzellen beobachtbar. Lymphocyten zeigen keine Beladung.

zu beobachten, so daß sie berechtigterweise als eine reguläre Phase des Vitamin-C-Einstroms in das Protoplasma der Zellen gewertet werden darf, die das Bindeglied zwischen der isolierten Ascorbinsäurebeladung des GOLGI-Apparates und der diffus-granulären Vitamin-C-Verteilung im Plasma darstellt.

Abb. 9. Alveolarphagocyt. Meerschweinchenlunge. Vitamin-C-Emission am GOLGI-Apparat.

Von großem Interesse ist nun die Beobachtung, daß im Syncytium der Placenta sowie in den Stromazellen der Placentazotten und in den Saumzellen des Dünndarms das Bild der Vitamin-C-Emission nicht zu sehen, sondern regelmäßig nur die isolierte Vitamin-C-Beladung des GOLGI-Apparates zu finden war. Das weist darauf hin, daß die Vitamin-C-Emission in das Plasma offenbar nur dann erfolgt, wenn der Vitamin-C-Einstrom für den Eigenbedarf der Zelle erfolgt, dagegen nicht, wenn die Ascorbinsäure lediglich Zellschranken

passiert. In diesen Fällen scheint der Golgi-Apparat gewissermaßen die Brücke für die Substanzpassage durch das Plasma zu bilden.

Um den Vorgang der Vitamin-C-Emission vom Golgi-Apparat aus in seinem Wesen einer näheren Klärung zuführen zu können, seien zunächst die heutigen wesentlichsten Erkenntnisse über die Bedeutung des Golgi-Apparates auf Grund der Untersuchungen mit den üblichen Methoden und der Vitalfärbung vorangestellt. Nach den zahlreichen, vorwiegend kasuistischen Untersuchungen, die über den Golgi-Apparat angestellt wurden, erscheint es als sicher, daß der Golgi-Apparat bei den Wirbeltieren ein konstant vorkommendes Zellorganell ist (Schrifttum bei Hertwig, Ries, Jacobs). Meist besitzt er netzartige, häufig auch gänzlich unregelmäßige Strukturen, die gewöhnlich polar in Kernnähe innerhalb eines besonders hellen Plasmabezirks gelagert sind. Für die Fixierung ist die Anwendung lipoidstabilisierender und nicht zu stark eiweißfällender Agentien erforderlich. Bei derart vorbehandelten Präparaten gelingt die histologische Darstellung alsdann durch langdauernde Osmierung in der Wärme oder durch Imprägnation mit Silbersalzen und nachfolgender sekundärer Reduktion. Bei Wirbellosen findet sich vielfach kein netzförmiger, zusammenhängender Golgi-Apparat, sondern nur diffus verteilte Körperchen, die mit den gleichen Maßnahmen sich darstellen lassen. Da für die Diagnose Golgi-Apparat oder besser in diesen Fällen »Golgi-Material« das Verhalten gegen Osmiumsäure und die sekundäre Imprägnierbarkeit mittels Silbersalzen kaum ausreicht, bereitet die Erkennung dann gewisse Schwierigkeiten, wenn die typischen netzartigen Strukturen und die charakteristischen Lagebeziehungen zum Kern nicht gegeben sind. Aus dem Verhalten gegenüber den genannten Fixierungsmitteln ließen sich gewisse, allerdings nur sehr grobe Schlüsse auf die Zusammensetzung der Golgi-Substanz ziehen. Man nimmt allgemein einen gewissen Lipoidreichtum und Eiweißsubstanzen als Hauptkomponenten an. Doch ist die Zusammensetzung offenbar einem regen Wechsel unterworfen, auch innerhalb der einzelnen Zelle zu verschiedenen Zeitpunkten. Insbesondere sind seit langem Schwankungen hinsichtlich der Osmierbarkeit bei verschiedenen Funktionszuständen bekannt. Als wesentlichste und gesicherte Erkenntnis hat sich weiterhin ergeben, daß die Quantität der Golgi-Substanz sich charakteristisch mit der Zellfunktion ändert und dabei gleichzeitig bezeichnende Strukturveränderungen am Golgi-Apparat beobachtbar sind. So besitzen, worauf besonders Kopsch hinwies, ruhende Zellen ein kleines, nur grob und wenig verzweigtes Golgi-Netz, während bei aktivierten Zellen die Substanz des Golgi-

Apparates zunimmt und reichliche Verzweigungen der Netzstrukturen auftreten, die in solchen Fällen weit über das ursprüngliche Polfeld am Kern hinausragen und oft sogar den ganzen Kern umfassen. Diese Erkenntnis war um so wertvoller, als damit ein sicheres, wenn auch methodisch mit Schwierigkeiten verknüpftes Kriterium für das Ausmaß der Zellfunktion für den Histologen zur Verfügung stand. Die praktische Anwendung dieser Tatsache hat beispielsweise für die Erforschung des Sekretionszyklus der Schilddrüse (Okkels), der Pankreaszelle (Ries) sowie für die Tätigkeit der Hauptstückzellen der Niere (Fischer) bedeutsame Ergebnisse gezeitigt.

Über die Funktion des Golgi-Apparates selbst aber brachten erst die Untersuchungen Jasswoins, Nassonovs mit Hilfe der Vitalfärbung einigen Einblick. Bekanntlich werden saure lipoidunlösliche, kolloidale Farbstoffe in bestimmten Zellen des Organismus granulär gespeichert. Mit großer Wahrscheinlichkeit ist diese Farbstoffspeicherung auf polare Adsorption durch bestimmte Zellsubstrate zurückzuführen (Ries). Nassonov erbrachte den Nachweis, daß das Substrat dieser Farbstoffspeicherung am Golgi-Apparat gebildet wird. Er fand nämlich völlige topographische Übereinstimmung der neugebildeten Farbstoffgranula mit dem nach den üblichen Methoden dargestellten Golgi-Apparat (z. B. Hauptstückzellen der Nierenkanälchen, Leberzellen). Ludford bestätigte den gleichen Vorgang auch für basische Farbstoffe und zeigte zugleich die Osmierbarkeit der Farbstoffgranula. Nassonov entwickelte auf Grund dieser Untersuchungsergebnisse die Vorstellung, daß gewisse kolloidale Farbstoffe am Golgi-Apparat angereichert und dort an Granula verankert werden und auf diesem Wege die granuläre Farbstoffspeicherung zustande kommt. Die Verankerung der Farbstoffe an die Substanzgrundlage der Granula erfolgt außerordentlich zäh, da die einmal derart gespeicherten Farbstoffe Lösungsmitteln erheblichen Widerstand entgegenzusetzen vermögen. v. Möllendorff faßt die Erscheinung der granulären Farbstoffspeicherung als eine Schutzmaßnahme gegenüber den körperfremden Farbstoffen auf, die durch diesen Prozeß aus dem Stoffwechselgeschehen der Zelle eliminiert werden. Denn die chemischen Umsetzungen, die für die eigentlichen Lebensvorgänge notwendig sind, spielen sich im sogenannten Grundplasma ab, d. h. dem nach Abzug von Zellorganellen und paraplastischen Gebilden verbleibenden Protoplasmarest. Es hat sich nun gezeigt, daß eine Reihe von Stoffwechselprodukten gleichfalls in der Golgi-Zone deponiert werden, wie z. B. Pigmentgranula in verschiedenen Zellen. Die Farbstoffgranula stellen also gewissermaßen Modellversuche des

natürlichen Geschehens dar und sie weisen den Weg, den physiologischerweise im Organismus vorkommende Substanzen nehmen, wenn sie aus dem chemischen und physikalisch-chemischen Geschehen im Grund- oder Hyaloplasma ferngehalten werden müssen.

Während man ursprünglich bezüglich der uns hier besonders interessierenden sauren kolloidalen Farbstoffe der Meinung war, daß ein Speicherungsvermögen dafür nur einer sehr beschränkten Anzahl von Zellen zukomme, so vor allem den Hauptstückzellen der Niere und den Zellen des reticulo-endothelialen Systems — das vermeintlich elektive Verhalten der Zellen dieses Systems gegenüber sauren Kolloiden führte ja zu seiner Aufstellung — hat sich zeigen lassen, daß der Kreis der dazu befähigten Zellen viel weiter zu ziehen ist. Vor allem hat die Speicherungsfähigkeit für saure Kolloide nichts mit dem natürlichen Phagocytosevermögen von Zellen zu tun, eine Auffassung, die sich im Schrifttum in Unkenntnis der Sachlage gelegentlich immer noch findet. Sie folgt vielmehr physikalisch-chemischen Gesetzlichkeiten, wie elektrischer Ladung, Permeabilität u. dgl. Sind die dafür notwendigen Bedingungen erfüllt, was z. B. durch geänderte Funktionslage der Zelle eintreten kann, so speichern auch Zellen, die sich normalerweise refraktär gegenüber sauren Farbstoffen verhalten. So speichert sogar die quergestreifte Muskelfaser, die sich normalerweise niemals mit Farbstoff belädt, während der Regeneration (Pfuhl). Die Zahl der nichtspeichernden Zellen ist heute so weit zusammengeschrumpft (vgl. auch v. Möllendorff), daß angenommen werden darf, daß unter bestimmten Bedingungen, die abhängig von der Zellfunktion sind, wohl fast jede Zelle prinzipiell Speicherungsfähigkeit erlangen kann.

Wenn wir nunmehr diese heute geltenden Anschauungen über Golgi-Apparat und Vitalfarbstoffe zur Erklärung der beim Vitamin-C-Stoffwechsel der Zelle zutage tretenden Erscheinungen heranziehen, so ergibt sich folgendes: Das Prinzip der Vitamin-C-Aufnahme am Golgi-Apparat und die dort erfolgende granuläre Bindung und Abstoßung in das Protoplasma hat ihr Vorbild in den Modellversuchen, die die granuläre Farbstoffspeicherung darstellen. Wie die sauren Farbstoffe wird das Vitamin C am Golgi-Apparat kondensiert und an ein Zellsubstrat verankert, das als Trägersubstanz dient. Diese so entstandenen kleinen Konzentrate werden alsdann in das Plasma abgestoßen und dort deponiert. Der Trägersubstanz kommt dabei vermutlich lediglich physikalisch-chemische Bedeutung zu, von ihr aus wird das Hyaloplasma, in dem sich die eigentlichen Lebensprozesse und damit die Oxydations-Reduktionsvorgänge abspielen, mit den erforderlichen

Ascorbinsäuremengen versorgt. Das Protoplasma ist damit in zweifacher Weise gegen ein unvermitteltes Eingreifen von aus der Blutbahn angebotenem Vitamin C geschützt, wodurch eine unerwünschte plötzliche Änderung der Oxydations-Reduktionslage des arbeitenden Protoplasmas vermieden werden kann. Einmal dosiert der Golgi-Apparat die Vitamin-C-Aufnahme der Zelle, denn trotz seiner leichten Löslichkeit kann das Vitamin C aus der Gewebsflüssigkeit nicht wahllos und in beliebiger Menge einströmen. So gelingt es niemals, um schon genannte Zellen als Beispiel zu wählen, die Granulosazellen des Graafschen Follikels oder Nebennierenmarkzellen durch bloße Vitamin-C-Zufuhr, selbst wenn der Organismus damit überschwemmt wird, zur Beladung zu bringen, sondern es bedarf dazu eines funktionellen Reizes noch dazu. Einzig die Ausscheidungs- und Resorptionsorgane verhalten sich naturgemäß in dieser Hinsicht anders. Aber selbst die unter bestimmten Bedingungen über den Golgi-Apparat in die Zelle gelangten Ascorbinsäuremengen sind in ihrer Wirkung durch die Kopplung an ein organisches Trägermaterial gebremst, wofür unten noch Beweise erbracht werden können. Erst durch den allmählichen Abstrom aus den durch die Emission in das Plasma gelangten Konzentraten greift die Ascorbinsäure in das Geschehen im Grundplasma ein.

Das an sich schon durch das analoge Verhalten von Vitalfarbstoffen und Vitamin C erschließbare Vorhandensein der »Trägersubstanz« läßt sich durch einfache Versuche aber absolut sicher erweisen. Farbstoffspeicherung und Vitamin-C-Speicherung lassen sich methodisch nebeneinander in derselben Zelle nachweisen. Gibt man nämlich einem Versuchstier, das einige Tage lang mit dem sauren Farbstoff Trypanblau vorbehandelt wurde, subcutan Vitamin C, so finden sich nach wenigen Minuten die Hauptstückzellen der Nierenkanälchen, die durch die Trypanblauvorbehandlung reichliche blaue Farbstoffgranula enthalten, gleichzeitig mit Vitamin C beladen. Dabei zeigt sich, daß jedes »Vitamin-C-Körnchen« von einer blauen Farbstoffhülle umgeben ist. Beide Substanzen benützen also dasselbe Trägermaterial. Wahrscheinlich besteht im lebenden Zustande keine »Farbstoffhülle« um den Vitamin-C-»Kern«, sondern vermutlich erfüllen beide Stoffe diffus das ganze Granulum, eine Frage, die an sich für die klar erwiesene gemeinsame Trägersubstanz ohne weiteren Belang ist. Das gleiche Verhalten läßt sich prinzipiell für jede Zelle zeigen, die eben fähig ist, sowohl Trypanblau wie Ascorbinsäure zu speichern. Da zur Bildung der Vitalfarbstoffgranula längere Zeit erforderlich ist, ist es lediglich nötig, vor dem Vitamin-C-Nachweis einige Tage hindurch Trypanblau zu verabreichen.

Die Bindung erfolgt in allen Fällen an das gleiche Substrat, gleichgültig, ob wie bei dem eben geschilderten Versuch Vitamin C an bereits vorbestehende Farbstoffgranula angelagert wird, oder, wie sich z. B. an Zwischenzellen des Hodens, Leberzellen u. dgl., die normalerweise schon Vitamin C enthalten, zeigen läßt, Trypanblau sich an vorbestehenden Vitamin-C-Granula anreichert. Das Ergebnis dieser Untersuchungen ist inzwischen durch Ries bestätigt worden, der bei Entwicklungsstufen mariner Lebewesen zeigte, daß die Ablagerung von Methylenblau gleichfalls um die Vitamin-C-Granula erfolgt.

Nicht nur hinsichtlich der feineren cytologischen Vorgänge bei der Farbstoff- und Vitamin-C-Speicherung herrscht diese eben geschilderte weitgehende Übereinstimmung, sondern es besteht auch eine auffallende Parallelität bezüglich der Fähigkeit von Zellen zur Farbstoffspeicherung und Ascorbinsäurebeladung. Dies fällt naturgemäß bei jenen Zellen und Organen besonders auf, die nur zu bestimmten Zeiten oder nur unter bestimmten Bedingungen zur Anreicherung saurer Vitalfarbstoffe in der Lage sind. In zahlreichen Fällen, in denen ein solches temporäres Farbstoffspeicherungsvermögen zutage tritt, ließ sich auch Vitamin-C-Speicherung nachweisen. So zeigte sich z. B., daß junge Osteoblasten und Odontoblasten Trypanblau speichern können. Sie enthalten während der Bildung von Knochen und Dentin auch Vitamin C. Fertige quergestreifte Muskelfasern speichern weder Trypanblau, noch enthalten sie Vitamin C. Regenerierende Fasern dagegen nehmen, wie bereits erwähnt, Trypanblau auf (Pfuhl), desgleichen enthalten embryonale, in der Fibrillenbildung begriffene Myoblasten Vitamin C. Von den Alveolarepithelien speichern im wesentlichen nur die sogenannten Reizformen oder Alveolarphagocyten (Seemann). Diese enthalten im Gegensatz zu den inaktiven Alveolarepithelien auch Ascorbinsäure. Die Reticulumzellen der Reaktionszentren des lymphatischen Gewebes speichern normalerweise keine sauren Vitalfarbstoffe. Jeckeln zeigte aber, daß sie Lithioncarmin (das umladbare Carmin wirkt nach Seki dort als saurer Farbstoff) speichern, wenn sie bei Diphtherietoxinvergiftung in Aktion treten. Das gleiche gilt bezüglich der Ascorbinsäure. Normalerweise speichern die Zellen der Reaktionszentren kein Vitamin C, dagegen finden sie sich reichlich bei der Diphtherieintoxikation beladen. Diese wenigen Beispiele, gerade an Hand von Zellen, die sich gewöhnlich refraktär gegenüber sauren Vitalfarbstoffen verhalten, lassen deutlich erkennen, wie die Fähigkeit diese Substanzen zu speichern mit der Vitamin-C-Beladung parallel geht. Die Erklärung dafür ist aber wohl nicht etwa in einem direkten Zusammenhange, in dem Sinne, daß das

Vorhandensein von Vitamin C die Speicherungsfähigkeit für saure Kolloide bedingt, zu suchen. Wie oben schon betont wurde, hängt die Fähigkeit zur Speicherung saurer Vitalfarbstoffe vielmehr von physikalisch-chemischen Gesetzlichkeiten ab. Nun wird sich unten ergeben, daß die Vitamin-C-Beladung von Zellen im Gefolge erhöhter Zellarbeit auftritt. Die plötzlich erlangte Fähigkeit zur intensiven Speicherung von sauren Kolloiden ist daher wohl als Folge dieser erhöhten Zellarbeit aufzufassen, die wohl die für die Kolloidspeicherung notwendigen physikalisch-chemischen Bedingungen schafft. Der merkwürdige Wechsel im Speicherungsvermögen gewisser Zellen erfährt damit eine zwanglose Erklärung.

Die Frage nach etwaigen engeren Beziehungen der Ascorbinsäure, in dem Sinne, daß das Vitamin C etwa integrierender Bestandteil des Golgi-Apparates ist, sei hier nur kurz gestreift. Sie ist nach dem Vorausgehenden dahin zu beantworten, daß das Vitamin C den Golgi-Apparat lediglich auf seinem Wege zur oder durch die Zelle benützt. In den Zellen, in denen kein Vitamin C nachweisbar ist, ist daher selbstverständlich der Golgi-Apparat mit anderen Methoden nachweisbar. Schließlich ist er auch, wie sich bei Untersuchungen an Skorbutschilddrüsen zeigen ließ, in normaler Weise auch im Skorbutzustande auf dem üblichen Wege darstellbar. Wohl aber ist das Material der Trägersubstanz, an die das Vitamin C gebunden wird, Substanzmaterial des Golgi-Apparates. Das zeigt sich besonders auch in der schon genannten Nachosmierbarkeit der Vitalfarbstoffgranula, denen ja das gleiche Substrat zugrunde liegt. Es ist aber vorstellbar, daß nach reger Tätigkeit des Golgi-Apparates ein Aufbrauch gewisser solcher als Trägersubstanzen dienenden Golgi-Apparatteile stattfindet. In solchen Fällen findet sich dann nach der üblichen Fixierung nur spärliches oder gar kein osmierbares Material mehr. Die von manchen Histologen vertretene Ansicht eines totalen Verschwindens des Golgi-Apparates aber erscheint keineswegs berechtigt, da ja der Golgi-Apparat nicht ausschließlich und nur aus osmierbarem Material besteht. Es ist durchaus wahrscheinlich, daß andere Teilkomponenten des Organells noch vorhanden sind, die lediglich jetzt mangels entsprechender Methoden dem Nachweis entgehen. Man sollte in diesen Fällen also lediglich von Verschwinden osmierbaren Materials sprechen.

Wir können nach dem Vorausgehenden, zusammenfassend gesagt, nunmehr als gesichert annehmen, daß der Vitamin-C-Stoffwechsel der Zelle generell über den Golgi-Apparat erfolgt. Es ließ sich zeigen, daß dort die Verankerung an ein organisches Substrat, das Substanzmaterial

des Golgi-Apparates darstellt, erfolgt, und die so gebildeten Vitamin-C-Granula in das Plasma abgestoßen werden. Die Vitamin-C-Granula sind also nicht plastosomaler Natur, sondern stellen Produkte des Golgi-Apparates dar. Die Aufnahme des Vitamins C in die Zelle erfolgt demnach unter aktiver Mitarbeit des Protoplasmas, und zwar in dosierter Weise, so daß eine plötzliche Überschwemmung des Grundplasmas durch überreichliches Angebot aus der Blutbahn ausgeschlossen erscheint.

Die granuläre Vitamin-C-Bindung unter energetischen Gesichtspunkten.

Im Gefolge der zahllosen Untersuchungen, die über Vitalfärbung angestellt wurden, hat sich ergeben, daß nur die normale, gesunde Zelle zur granulären Farbstoffspeicherung befähigt ist. Absterbende Zellen färben sich dagegen diffus an, der sonst in Granula lagernde Farbstoff durchtränkt das gesamte Protoplasma. Weiterhin tritt als besonders charakteristische Erscheinung in solchen Fällen auch Anfärbbarkeit des Kernes auf, der sich normalerweise niemals mit Vitalfarbstoffen anfärbt. Nassonov hat zeigen können, daß der Verlust der granulären Farbstoffspeicherung und die eintretende Diffusfärbung unter Sauerstoffmangel, also bei herabgesetzter Zellatmung auftreten. Werden Frösche beispielsweise längere Zeit in H_2-Atmosphäre gehalten, so tritt nach einiger Zeit bereits eine tiefe Senkung des r_H-Wertes des Protoplasmas, nachweisbar durch Redoxindikatoren, ein. Ist der r_H-Wert auf ein gewisses Maß gesunken, so können zugeführte Vitalfarbstoffe nicht mehr granulär gespeichert werden, sondern es tritt diffuse Anfärbung auf. Vor der experimentell erzeugten r_H-Wertsenkung bereits bestehende Farbstoffgranula bleiben dagegen als solche bestehen. Nassonov hat auch die dabei auftretende Kernfärbung als Folge des Sauerstoffmangels aufgefaßt. Ries hat aber zeigen können, daß das Kernphänomen auf reversibler Entmischung saurer Kerneiweiße beruht, die alsdann zur Farbstoffadsorption führt. Im Normalzustand dagegen findet keine Farbstoffadsorption statt, da die normalen Kerneiweißteilchen einen diffusen Solvatmantel besitzen, so daß keine freien adsorptionsfähigen Oberflächen vorhanden sind. Vermutlich wirkt die mit dem Sauerstoffmangel verbundene Ansäuerung flockend auf die sich durch ihre Labilität und sehr leichte Flockbarkeit auszeichnenden Kerneiweiße.

Die für uns wesentlichere Erscheinung der fehlenden Granulabildung bei herabgesetzter Oxydationsfähigkeit der Zelle aber zeigt uns, daß die granuläre Speicherung ein energieverbrauchender Vorgang ist

(S. n. d. bei Nassonov). Bekanntlich deckt die Zelle ihren gesamten Energiebedarf aus den im Grundplasma stattfindenden Oxydationsvorgängen. Der Verbrauch der so erzeugten Energie erfolgt bei den meisten Zellen in Form unserer Beobachtung schwer zugänglichen Arbeitsleistungen und nur in wenigen Fällen, wie z. B. bei der Muskelzelle, können wir uns eine klare Vorstellung hierüber bilden. Für die unsichtbaren Arbeitsleistungen des Protoplasma ist der Begriff der Arbeit im Bereiche kleinster Dimensionen geprägt worden. Die Energie wird verbraucht, um das Nebeneinanderbestehen reagierfähiger Stoffe im Protoplasma zu gewährleisten, wodurch eine schlagartige Umsetzung nach Art einer im Reagenzglas erfolgenden Reaktion verhütet wird, sondern vielmehr ein dosiertes, zeitlich gesteuertes Ablaufen chemischer Umsetzungen erfolgen kann, was für die Erhaltung des Lebens erforderlich ist. So werden Vorgänge, wie Diffusion u. dgl., die nach physikalisch-chemischen Gesetzlichkeiten zwangsläufig eintreten, immer wieder rückgängig gemacht und damit, kurz gesagt, die Heterogenität des Protoplasmas aufrecht erhalten. Das getrennte, dosierte Ablaufen der für das Leben erforderlichen chemischen Umsetzungen auf engstem Raume in derselben Zelle nebeneinander wird nach dieser Auffassung nur unter Aufwand von Energie möglich, die die Zelle durch die Verbrennungsprozesse im Grundplasma gewinnt. Ist diese Energie herabgesetzt oder gar nicht mehr vorhanden, so herrschen im Protoplasma nicht mehr biologische Gesetze, sondern physikalische und chemische Vorgänge nehmen mehr und mehr ihren eigengesetzlichen Weg, sie erreichen bald ihren Gleichgewichtszustand, womit der Zelltod eintritt.

Diese Überlegungen auf das Prinzip der granulären Vitamin-C-Speicherung im Protoplasma angewendet, ergeben nun einen sehr wesentlichen Einblick in die Bedeutung der Trägersubstanz. Für die experimentelle Untersuchung des Problems erwies sich als günstigstes Objekt die Hauptstückzelle der Nierenkanälchen. Wie schon erwähnt wurde, gelingt es durch subcutane Injektion von Ascorbinsäure eine intensive Vitamin-C-Beladung der genannten Zellen zu erzeugen. Die maximale Beladung findet sich in der Zeit von etwa 10 Minuten bis $1\,^1/_2$ Stunden nach der Ascorbinsäureinjektion, während der auch der Titrationswert der ausgeschiedenen Ascorbinsäure im Harn seinen Höhepunkt besitzt (Giroud und Leblond). Die Ausscheidung erfolgt nach Untersuchungen von Leblond am Glomeruluspunktat zunächst im Glomerulus, während in den Hauptstückzellen auf dem Wege der bekannten Rückresorptionsvorgänge Vitamin C angereichert wird. Die Bildung und Durchwanderung der Vitamin-C-Granula erfolgt hier offen-

bar in sehr raschem Tempo, da das gesamte überschüssige Vitamin C in relativ kurzer Zeit ausgeschieden wird. Drosselt man daher in einem beliebigen Moment während der Hauptausscheidungszeit die Sauerstoffzufuhr der Nierenzelle ab, so ist die Gewähr gegeben, daß die Bildungsphase der eben entstehenden Körnchen gestört wird. Nun kann man durch Drosselung der Sauerstoffzufuhr natürlich nicht die Oxydationsvorgänge in der Zelle schlagartig zum Stillstand bringen, aber sie genügt doch, die Bildung der in so raschem Tempo und in ungeheurer Zahl entstehenden Granula zu beeinflussen, zumal das Sauerstoffbedürfnis der Niere bekanntlich sehr hoch ist. Der Versuch ist im einzelnen in folgender Weise durchführbar: Mäuse, die etwa 3 mg Ascorbinsäure injiziert erhalten, werden 10—15 Minuten nach der Injektion in N_2-Atmosphäre gesetzt und sofort nach dem Tode die Nieren mit $AgNO_3$ in der üblichen Anordnung behandelt. Das Ergebnis zeigt die Abb. 10, der die Abb. 11, die das Normalbild der Vitamin-C-Verteilung in der Niere während der Ausscheidung wiedergibt, gegenübergestellt ist.

Die in Abb. 10 getroffenen Hauptstückzellen enthalten keine Spur reduzierten Silbers, während im Normalbild deutlich die intracelluläre Lagerung der Silbergranula erkennbar ist. Dafür findet sich im Zwischengewebe der Kanälchen extracellulär gelagertes, wolkig verteilt, diffuses, nicht granuläres Silber, das dort tiefschwarze Niederschläge bildet. Die Störung der Sauerstoffzufuhr hat demnach nicht nur die Bildung von Vitamin-C-Granula unterdrückt, sondern, was noch viel wesentlicher erscheint, die Hauptstückzellen sind völlig frei von Vitamin C, während sie bei normaler ungestörter Ausscheidung regelmäßig beladen sind. Die Zelle eliminiert offenbar unter dem Einfluß der gestörten Oxydation ihren gesamten augenblicklichen Vitamin-C-Bestand, da sie nicht mehr in der Lage ist, die durchströmende Ascorbinsäure granulär zu binden. Dieser Umstand beleuchtet nun schlagartig das tiefere Wesen der Bindung des Vitamins C an Trägersubstanzen. Diese Kopplung an neu entstehende Granula am Golgi-Apparat bedeutet eine unter einem Kräfteaufwand vollzogene Absonderung der Ascorbinsäure aus dem Grundplasma. Das Freisein von Vitamin C der unter gestörter Sauerstoffzufuhr befindlichen Nierenzellen deutet darauf hin, daß diffuses, nicht granulär gebundenes Vitamin C nicht gleichgültig für die Funktion des Protoplasmas ist, denn man hätte analog dem Verhalten der Vitalfarbstoffe bei gestörter Oxydation erwartet, daß das Vitamin C bei diesen Versuchen diffus das Protoplasma durchtränken würde. Die Zelle entledigt sich aber offensichtlich momentan der ungebundenen, freien Ascorbinsäure, da sie wohl in dieser Form die Funktion des

Plasmas schädlich beeinflußt. Damit wird nun auch erklärbar, warum es keine Hypervitaminose C gibt. Die Zelle ist gegen jegliche Vitamin-C-Überdosierung geschützt durch die aktive Regulation der Aufnahme

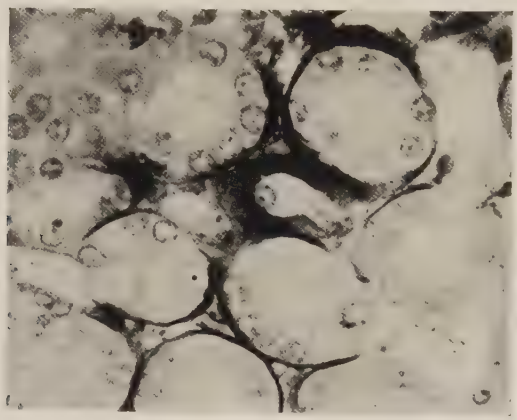


Abb. 10. Verlust der granulären Vitamin-C-Bindung der Nierenhauptstückzellen bei Sauerstoffmangel. Eliminierung des Vitamins C aus dem Protoplasma.

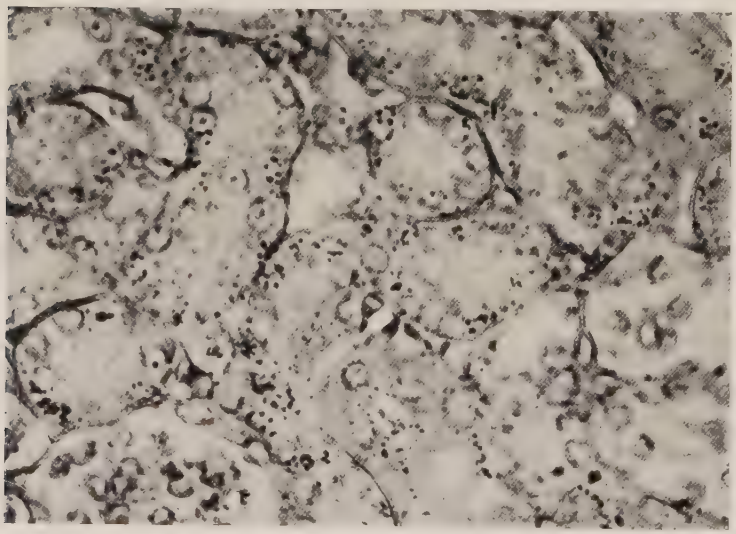


Abb. 11. Granuläre Vitamin-C-Bindung in der Niere bei ungestörter Sauerstoffzufuhr.

am Golgi-Apparat. Aber auch das auf diesem Wege in das Plasma gelangte Vitamin C greift noch nicht unmittelbar in die Oxydations-Reduktionslage der Zelle ein, sondern wird in kleinen, aus dem Grund-

plasma abgesonderten Konzentraten, den Granula, deponiert. Erst von diesen Konzentraten aus erfolgt offenbar ein allmähliches und geregeltes Eingreifen in die Vorgänge im Grundplasma. Man muß demnach annehmen, daß durch die Bindung an die Trägersubstanz das Vitamin C gegen ein zu abruptes Wirksamwerden blockiert ist. Diese Auffassung wird durch neuere Untersuchungsergebnisse von Ries bestätigt. Im Gefolge von Untersuchungen über Stoffsonderungen in Eizellen und frühen Furchungsstadien mariner Lebewesen konnte Ries zeigen, daß die Vitamin-C-Granula keine Beziehung zu den Zellorten aufweisen, die im Reduktionsvermögen für basische Vitalfarbstoffe führend sind, obgleich die Ascorbinsäure gerade durch ihr außerordentlich starkes Reduktionsvermögen gekennzeichnet ist. Vitamin-C-speichernde Granula reichern überdies leicht zu reduzierende Farbstoffe an, ohne sie aber reduzieren zu können. Das zeigt wohl klar, daß die Oxydations-Reduktionsvorgänge sich nicht an den Granula selbst, sondern im Grundplasma abspielen, die Granula wirkliche »Depots« darstellen und die dort lagernde Ascorbinsäure in ihrer Wirkung irgendwie gebremst ist.

Über den Zusammenhang der Vitamin-C-Aufladung der Zelle mit bestimmten Protoplasmaleistungen.

Bekanntermaßen zeichnen sich eine Reihe innersekretorischer Organe durch einen normalerweise stets anzutreffenden hohen Ascorbinsäuregehalt aus. Dazu gehören vor allem Nebennierenrinde, Corpus luteum, Hoden und Hypophyse. Man hat aus dem Vorkommen des Vitamin C in diesen Organen sogleich weitgehende Schlüsse auf bestimmte, und zwar spezifische Zusammenhänge der Ascorbinsäure mit den von dort produzierten Hormonen gezogen. So sollte das Vitamin C in der Nebennierenrinde den Stabilisator für das im Mark entstehende Adrenalin darstellen. Schröder vermutete besondere Zusammenhänge der Ascorbinsäure mit Hormonen, die im Pigmentstoffwechsel eine Rolle spielen, weil sich Vitamin C besonders reichlich in Nebennierenrinde und Hypophyse findet. Schließlich wies Giroud auf ein auffälliges paralleles Vorkommen von Carotin bzw. Vitamin C und Vitamin A hin. Schon die Tatsache, daß der Vitamin-C-Mangel sich in wesentlich vielseitigerer Weise offenbart und ein Darniederliegen mannigfaltiger Zellfunktionen erkennen läßt, spricht gegen ein spezielles Wirkungsverhältnis zu einem oder auch mehreren bestimmten Hormonen. Vielmehr ist ähnlich, wie man für die Bedeutung der Ascorbinsäure bei der Pflanze annimmt, auch bezüglich ihrer Aufgabe im tierischen Körper an allgemeine und primitive Funktionen im Plasma

zu denken (v. Szent Györgyi). Die Ergebnisse der in den letzten Jahren von allen Seiten in sehr großem Umfange durchgeführten Vitamin-C-Bestimmungen in den verschiedensten Organen sprechen ganz in diesem Sinne. Dabei hat sich nämlich ergeben, daß praktisch in fast jedem Organ und fast in jeder Zelle unter bestimmten Bedingungen Vitamin C gefunden werden kann. Da uns für das in Rede stehende Problem viel weniger der zahlenmäßig erfaßte Gesamtgehalt von Organen, sondern vielmehr die Einzelbeladung der Zelle interessiert, beschränke ich mich auf die fast ausschließliche Wiedergabe der histochemischen Untersuchungsbefunde.

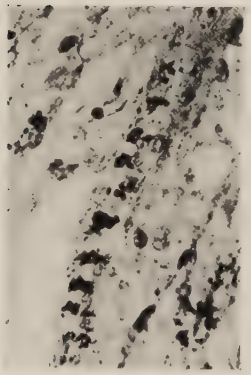


Abb. 12. Vitamin C in embryonalen quergestreiften Muskelfasern. Schweineembryo.

Eine Reihe von Geweben, die im fertig differenzierten Zustande keine Spur histochemisch erfaßbarer Ascorbinsäure erkennen lassen, sind im embryonalen Zustande äußerst dicht beladen. So findet sich in der quergestreiften Muskulatur, nur im embryonalen Zustande, nämlich während der Zeit der Fibrillendifferenzierung, Vitamin C (Abb. 12). Die fertige quergestreifte Muskelfaser dagegen zeigt kein Reduktionsvermögen für saure Silbernitratlösung. In Übereinstimmung

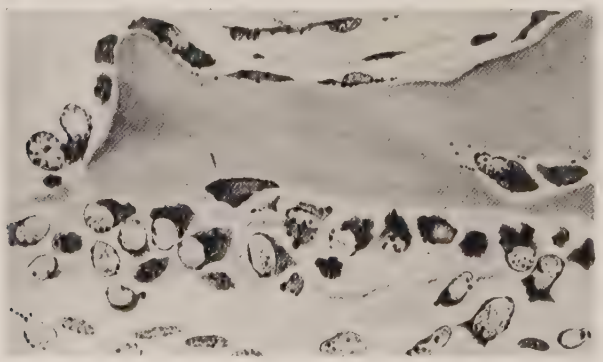


Abb. 13. Vitamin C in Osteoblasten. Junges Knochenbälkchen.

damit steht der geringe Reduktionstiter der Skelettmuskulatur. Für den Herzmuskel gilt ein analoges Verhalten. Osteoblasten, Chondroblasten, also Zellen, die geformte Sekrete erzeugen, weisen gleichfalls Vitamin-C-Beladung auf, aber nur so lange, als tatsächlich Aufbau von Knochen-

bzw. Knorpelgrundsubstanz erfolgt (Abb. 13). Für die Odontoblasten wiesen Demole, Cahen und Pfalz gleichfalls Vitamin-C-Beladung auf histochemischem Wege nach.

Schließlich konnte gezeigt werden, daß in dem normalerweise histochemisch vitamin-C-freien Nebennierenmark im Gefolge der Adrenalinausschüttung eine schlagartige Vitamin-C-Beladung auftritt. Nach den Vorstellungen von Cannon stellt das Nebennierenmark gewissermaßen ein schlummerndes Organ dar, das explosionsartig in Tätigkeit tritt, wenn der Organismus äußere Reize (»Katastrophen«) mit Adrenalinausschüttung beantwortet. Psychische Alteration, wie Schreck, Angst

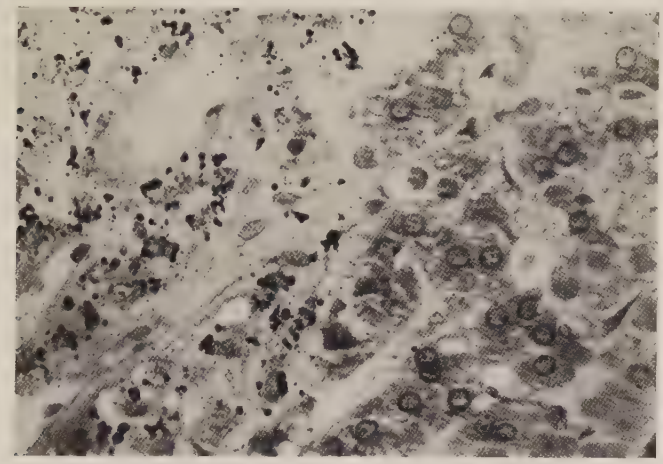


Abb. 14. Nebenniere Rindenmarkgrenze. Hingerichteter. Mark beladen, Rinde fast entleert.

vermögen bekanntermaßen zur Adrenalinausschüttung zu führen. In eklatanter Weise konnte beim Hingerichteten das Bild der Mobilisation des Nebennierenmarkes beobachtet werden. Die gesamten adrenalinbildenden Zellen zeigen dichteste Vitamin-C-Beladung, während die Rinde fast entleert war (Abb. 14). Die Erscheinung läßt sich leicht experimentell reproduzieren und dadurch der Zusammenhang Adrenalinausschüttung-Vitamin-C-Aufladung sicherstellen. Die Abb. 15a gibt die Rindenmarkgrenze der Nebenniere eines durch rasche Decapitation getöteten Kaninchens wieder. Die Markzellen sind völlig frei von Vitamin-C-Granula. Die Abb. 15b dagegen zeigt die Rindenmarkgrenze nach vorausgehender Splanchnicusreizung. Die Markzellen enthalten nunmehr Vitamin-C-Granula. Auch am Suprarenalorgan von Torpedos konnte derselbe Effekt erzielt werden. Hier gelingt die Reizung der

zum Suprarenalorgan führenden Nerven besonders leicht, da das Organ direkt an dem nur von hauchdünnem Peritoneum bedeckten Sympathicus liegt. Auch hier tritt nach Sympathicusreiz Vitamin-C-Beladung der vorher leeren Zellen auf, obwohl das Rindenorgan, das Interrenalorgan weit ab davon entfernt und getrennt liegt.

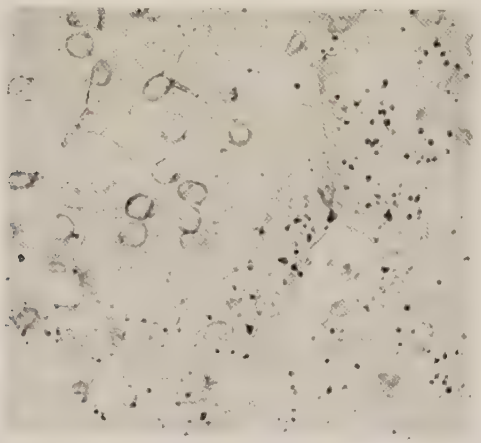


Abb. 15a. Rindenmarkgrenze der Nebenniere beim Kaninchen.

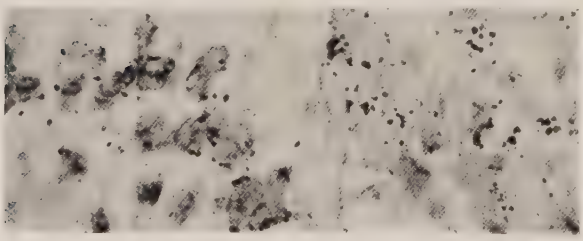


Abb. 15b. Rindenmarkgrenze nach Sympathicusreizung. Markzellenbeladung.

In zahlreichen anderen Organen läßt sich eine durchaus analoge Erscheinung beobachten. So sei auf das besonders instruktive Verhalten der schon erwähnten Granulosazellen des Graafschen Follikels nochmals verwiesen. Sie sind im normalen Follikel stets unbeladen, beladen sich aber sofort nach Platzen des Follikels mit Vitamin C, d. h. also dann, wenn sie nunmehr zu sekretorisch tätigen Elementen des aus ihnen entstehenden Gelbkörpers werden. Die Beladung tritt kurze Zeit nach dem Follikelsprung auf, wie am frisch geplatzten Follikel des Kaninchens gezeigt werden konnte. Die Erscheinung ist hormonal

reproduzierbar, wenn durch Prolangaben eine vorzeitige Luteinisierung ausgelöst wird (siehe dazu Abb. 5). Titrimetrische Vitamin-C-Untersuchungen haben dabei gezeigt, daß der Vitamin-C-Gehalt des Corpus luteum parallel seinem Funktionszyklus geht. Er steigt mit zunehmender Reife des Corpus luteums an, erreicht im Blütestadium des Gelbkörpers seinen höchsten Wert und sinkt dann im Gefolge des allmählichen Abbaues wieder ab (Giroud und Leblond, Gerson, Glick und Biskind, Policard und Ferrand).

Ähnliche Erscheinungen der Vitamin-C-Beladung von Zellen unter funktionellem Anreiz konnten an Schilddrüse, Epithelkörperchen, generativen Hodenzellen, Sekretröhrchen der Speicheldrüsen beobachtet

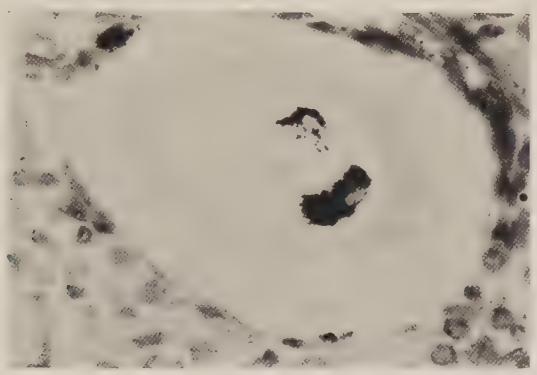


Abb. 16. Vitamin-C-beladene Phagocyten in einem atretischen Follikel beim Abbau des hyalinisierten Eies.

werden. Nach Pilocarpinreiz beladen sich bei der Maus beispielsweise die Hauptstücke der Speicheldrüsen. Ruhende Histiocyten im Omentum majus des Meerschweinchens fanden sich regelmäßig frei von Vitamin C. Tätige Histiocyten dagegen zeigen Vitamin-C-Aufladung, wie sich in zahlreichen Fällen nachweisen ließ. So werden z. B. in die Subcutis oder in Muskulatur eingezogene Catgutfäden nach wenigen Tagen von einem Saum vitamin-C-beladener Histiocyten umlagert. Fibrinschollen im frischen Corpus luteum oder die Reste absterbender Eier in atretischen Follikeln werden gleichfalls durch vitamin-C-beladene histiocytäre Zellen abgebaut (Abb. 16). Die Tätigkeit des aktiven Histiocyten besteht in Phagocytose und intracellulärer Verdauung durch im Zelleib entstehende Fermente und nur, während er diese Tätigkeit ausübt, zeigt er die Ascorbinsäurebeladung.

Diese Beispiele mögen genügen, um zu zeigen, daß bei vermehrter Arbeitsleistung Vitamin-C-Aufladung zahlreicher Zellen erfolgt. Es

fragt sich nun, welche Art von Zellarbeit den vermehrten Vitamin-C-Anstrom zur Folge hat. Die quergestreifte Muskelzelle zeigt bei oder nach kontraktiler Leistung keine Vitamin-C-Beladung, ebensowenig, wie etwa die Hauptstückzellen der Niere im Gefolge erhöhter Ausscheidungsarbeit (selbstverständlich außer Vitamin-C-Ausscheidung!) irgendwelche Aufladung erkennen lassen. Das wesentliche Prinzip, das allen jenen Arbeitsleistungen, die von einer Vitamin-C-Beladung der Zelle begleitet werden, zugrunde liegt, ist gerade am Beispiel der Muskelzelle besonders klar ablesbar. Wie schon erwähnt, belädt sie sich nicht bei Muskelarbeit, sie zeigt dagegen sehr starke Beladung während des Aufbaues der Myofibrillen im embryonalen Zustande. Die Anwesenheit der Ascorbinsäure scheint also nur zur Zeit der Fibrillensynthese im Protoplasma erforderlich zu sein. Überprüfen wir nun daraufhin die übrigen aufgeführten Beispiele, so ergibt sich, daß es sich bei allen diesen gesteigerten Arbeitsleistungen von Zellen um irgendwelche Synthesevorgänge handelt: Bildung von Knorpel- und Knochengrundsubstanz, Erzeugung von Hormonen, von extracellulären und auch intracellulären Fermenten, wie im Falle der Histiocyten. Man darf aus der Fülle des Materials wohl schließen, daß demnach die Ascorbinsäure ein für die Stoffsynthese im Protoplasma irgendwie wesentlicher Faktor ist. Wie die angeführten Beispiele zeigen, ist der Kreis der Stoffe, in deren Erzeugungsvorgang die Ascorbinsäure offenbar eingreift, ein sehr weiter, er umfaßt geformte Sekrete, Fibrillen, Hormone und Fermente. Damit soll aber nicht gesagt sein, daß überhaupt jegliche Stoffsynthese im Organismus an die Anwesenheit von Vitamin C gebunden sei. Gewisse, noch nicht abgeschlossene Versuche sprechen dafür, daß für manche Syntheseleistungen des Protoplasmas andere Substanzen mit ähnlichen Eigenschaften wie die Ascorbinsäure verwendet werden, ja, daß vielleicht sogar verschiedene derartige Substanzen bei ein und demselben Organ, aber bei verschiedener Tierart in Frage kommen können. Soviel aber kann als gesichert angenommen werden, daß für eine große Reihe von Organen das Vitamin C für eine geregelte und normale Stoffproduktion erforderlich ist.

Für die Bedeutung der Ascorbinsäure in dem genannten Sinne müssen sich entsprechende Anhaltspunkte am Skorbutorganismus erbringen lassen. In der Tat läßt sich für eine ganze Reihe von Substanzen, die einer leichten Beobachtung zugänglich sind, zeigen, daß ihre Bildung im Skorbutorganismus beeinträchtigt ist und in manchen Fällen sogar völlig unterbleibt. So läßt sich zeigen, daß schon wenige Tage nach Beginn vitamin-C-freier Ernährung frischerzeugte Frakturen

beim Meerschweinchen keinerlei Regenerationsneigung zeigen. Obwohl von Skorbutsymptomen nach etwa fünftägiger vitamin-C-freier Kost noch nichts bemerkbar ist, hat der Organismus doch bereits seine Fähigkeit zur Knochenregeneration eingebüßt. Es läßt sich in solchen Fällen keinerlei Kallusbildung nachweisen (Schilowzew, Jessey und Korpassy, Hanke, Lauber, Tonutti, Klein), während normal ernährte Kontrolltiere schon nach 5 –6 Tagen reichliche Kallusbildung aufweisen. Wie hier gleich bemerkt sei, führt aber eine überschießende Vitamin-C-Zufuhr zu keiner verbesserten oder beschleunigten Kallusbildung (Lauber, Klein), was nach den dargelegten Vorstellungen über den Vitamin-C-Stoffwechsel der Zelle ja ohne weiteres einleuchtend erscheint. Kollagene Fibrillen können gleichfalls vom Skorbutorganismus nicht mehr regulär produziert werden. Mazoué zeigte nämlich, daß nach intraperitonealer Injektion einer Kieselguraufschwemmung beim Skorbuttier zwar ein Zellwall um die einzelnen Partikel entsteht, aber im Gegensatz zum Normaltier keine Bildung von kollagenen Fibrillen zur Abkapselung eintritt. Wird dagegen dem Skorbuttier, nachdem bereits solche faserfreien Kapseln entstanden sind, Apfelsinensaft verabreicht, so sind nach 3 Tagen bereits kollagene Fibrillen in den Granulomkapseln nachweisbar.

Auch die Glykogenbildung ist bei Vitamin-C-Mangel gestört. Bei skorbutischen Meerschweinchen finden sich subnormale Werte. Ascorbinsäureinjektionen beim Skorbuttier führen wieder zur vermehrten Glykogenanlagerung (Shimamura). Über ein ähnliches Ergebnis berichten Terbrüggen und Fischbach, wobei allerdings in ihren Versuchen das für den Glykogenaufbau sehr wesentliche Vitamin B_1 keine Berücksichtigung bei der verwendeten Skorbutdiät fand. Schließlich berichten Bersin, Jusatz und Köster über verminderte Antikörperbildung bei Vitamin-C-Mangel, was inzwischen mehrfach bestätigt wurde, so zuletzt von Philippe-Baratte.

Besonders instruktiv für die Beziehungen des Vitamins C zu Syntheseleistungen der Zelle aber ist das Verhalten des im Pigmentstoffwechsel der Haut eine wesentliche Rolle spielenden sogenannten Dopaferments. Dopa stellt bekanntlich die Abkürzung für Dioxyphenylalanin dar. Werden Hautstückchen in eine $1\,^0/_{00}$ige Dopalösung gelegt, so tritt Schwarzbraunfärbung der untersten Epidermislagen ein Aus dem Dioxyphenylalanin soll dabei durch Einwirkung einer spezifischen Dopaoxydase Melanin entstehen. Die Dopareaktion liefert demnach den Nachweis dieser Dopaoxydase, die sich in Geweben mit natürlichem Pigmentbildungsvermögen findet. (Basale Epithelzellen der

Epidermis, Retina während der Embryonalentwicklung, nicht dagegen in den Chromatophoren des Bindegewebes.) Die Dopareaktion wurde schon wiederholt zur Klärung der Rolle des Vitamins C im Pigmentstoffwechsel herangezogen, besonders nachdem v. Szent Györgyi gezeigt hatte, daß die Bildung von Melanin in vitro durch Ascorbinsäure gehemmt wird. So fand nun Schröder, daß die Dopareaktion in der Ohrhaut normaler Meerschweinchen durch Zusatz von Ascorbinsäure zum Dopareagens gleichfalls gehemmt wird. Nachprüfung durch Berger bestätigte dies, allerdings mit der Einschränkung, daß dazu Ascorbinsäurekonzentrationen von unphysiologischer Höhe erforderlich sind. Eigene Untersuchungen, gemeinsam mit Skutta, führten zu dem gleichen Ergebnis. Man könnte nun aus den Versuchen Schröders den Schluß ziehen, daß die Ascorbinsäure ein die Pigmentbildung in der Haut hemmender Faktor sei. Gestützt scheint diese Auffassung dadurch, daß auch beim Skorbut des Menschen gelegentlich Pigmentierungen beobachtbar sind (Morawitz), die aber noch keiner eingehenden Untersuchung bisher unterzogen wurden. Nach dem negativen Ausfall der Dopareaktion bei Ascorbinsäurezusatz müßte angenommen werden, daß im Skorbutzustand die Dopareaktion besonders stark positiv ausfällt, da ja nunmehr der angebliche Hemmungsfaktor aus dem Organismus entfernt ist. Diese leicht vorzunehmende Gegenprobe führte nun zu dem Ergebnis, daß in der Skorbuthaut die Dopareaktion vollständig negativ ausfällt. Dabei benutzten wir, wie Schröder, die Ohrhaut scheckiger Meerschweinchen und stellten die Dopareaktion sowohl in gepufferter, wie ungepufferter Lösung an. Sie fiel schon nach 10 Tagen vitamin-C-freier Ernährung vollständig negativ aus. Die Abb. 17 zeigt die Dopareaktion normaler Ohrhaut zum Vergleich, Abb. 18 zeigt den Reaktionsausfall bei Skorbuthaut. Der Versuch zeigt klar, daß bei natürlicher Versuchsanordnung das Vitamin C keineswegs einen Hemmungsfaktor der Pigmentbildung darstellt, sondern im Gegenteil, daß das Dopaferment in den Epidermiszellen bei Abwesenheit von Ascorbinsäure gar nicht mehr gebildet werden kann. Der Versuch zeigt darüber hinaus in eindringlicher Weise, daß man nicht ohne weiteres die Ergebnisse von in vitro-Versuchen auf das strukturierte Milieu der lebenden Zelle übertragen kann. Wenn das Vitamin C in vitro die Umwandlung von Dioxyphenylalanin durch die bereits vorhandene Dopaoxydase von bestimmten Konzentrationen an zu unterbinden vermag, so entspricht dies keineswegs der natürlichen Eingriffsweise der Ascorbinsäure in den Pigmentbildungsvorgang. Der Versuchsausfall am Skorbuttier beweist uns wiederum die Notwendigkeit der Ascorbin-

säure für einen Synthesevorgang in der Zelle. Tatsächlich läßt sich zeigen, daß nach Zufuhr von Ascorbinsäure beim Skorbuttier etwa vom 3. Tage an wieder eine positive Dopareaktion auftritt, wobei sich durch vorhergehende Exzision von Hautstückchen leicht der vorherige negative Ausfall der Reaktion bei demselben Tier kontrollieren läßt. Nach der im vorausgehenden Abschnitt dargelegten Regulation des

Abb. 17. Dopa-Reaktion. Ohrhaut. Normales Meerschweinchen.

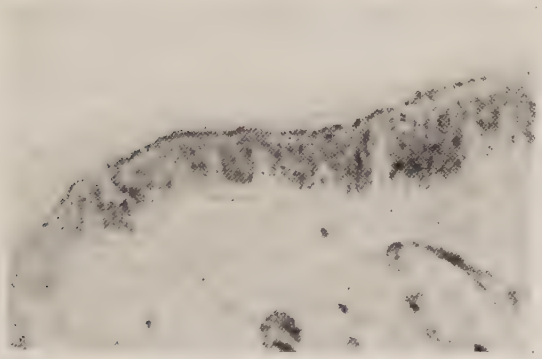


Abb. 18. Dopa-Reaktion. Ohrhaut. Skorbut-Meerschweinchen. Vollständig negativ.

Vitamin-C-Stoffwechsels der Zelle durch ein aktiv tätiges Zellorganell ist der Widerspruch im Ausfall der Dopareaktion in den beiden genannten Versuchsanordnungen keineswegs allzu überraschend. Denn es ist klar, daß im herausgeschnittenen Hautstück die in vitro zugesetzte Ascorbinsäure gar nicht mehr ihren regulären physiologischen Weg in die Zellen nehmen kann, sondern, daß sich hier Umsetzungen nach chemischen Gesetzlichkeiten abspielen, die mit den Leistungen der Zelle unter natürlichen Bedingungen keineswegs identifiziert werden dürfen.

Die natürliche Einwirkungsweise des Vitamins C, nämlich der Einfluß auf die Bereitstellung der Dopaoxydase kann dabei ohnehin nicht mehr zum Vorschein kommen, da das Ferment ja bereits fertig in den Zellen liegt. Eine Beeinflussung der Dopareaktion durch Ascorbinsäure ist übrigens auch nicht beobachtbar, wenn Tiere mit Ascorbinsäure überschwemmt und im Anschluß daran dann Hautstückchen exzidiert werden, mit denen die Dopareaktion angestellt wird. Auf »physiologischem« Wege der Zelle angebotene Ascorbinsäure vermag also nicht hemmend auf die Reaktion zu wirken. Das Beispiel der Dopareaktion ergibt wohl die Berechtigung darauf hinzuweisen, daß grundsätzlich bei allen Vitamin-C-Untersuchungen, die mit Geweben in vitro durchgeführt werden, größte Vorsicht hinsichtlich etwaiger Schlußfolgerungen über die Bedeutung der Ascorbinsäure im lebenden Organismus angebracht erscheint.

Schließlich sei noch erwähnt, daß von einer Überpigmentierung beim tierischen Skorbut nichts beobachtbar ist.

Die beim menschlichen Skorbut beschriebenen Pigmentierungen bedürfen, um auch hier zu einer näheren Klärung zu gelangen, dringend einer eingehenden Untersuchung.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß sich eine Reihe von Beispielen erbringen läßt, die klar zeigen, daß im Skorbutzustande verschiedene Substanzen vom Protoplasma nicht mehr erzeugt werden können, wofür der Mangel des sinnfällig nachweisbaren Dopaferments einen besonders instruktiven Beleg darstellt.

Über die eigentliche biologische Bedeutung der Ascorbinsäure.

Zunächst sei daran erinnert, daß v. Szent Györgyi von jeher die Wichtigkeit der Ascorbinsäure für vermutlich ganz allgemeine Protoplasmafunktionen betont hat und den Schluß zog, daß sie durch ihre starke Reduktionskraft das Protoplasma vor der Oxydation schütze. Bekanntlich bildet die Ascorbinsäure mit ihrer reversiblen Oxydationsstufe ein sogenanntes Redoxsystem, gleich dem Glutathion, dem Laktoflavin und anderen Substanzen. Die Potentialmessungen von Ascorbinsäurelösung in Phosphatpuffer bei $p_H = 7$ ergeben nach v. Szent Györgyi Werte von etwa 0,09 Volt, was einem r_H-Wert um 15ent-spricht. Wuemser gibt ähnliche Werte an. Bestimmungen des Redoxpotentials lebender Zellen mittels Redoxindikatoren ergaben, daß dieses bei den verschiedensten Zellen weitgehend von der Sauerstoffspannung

des Milieus abhängig ist und innerhalb bestimmter Bereiche variiert. Der r_H-Wert sinkt von etwa 20 unter aeroben Bedingungen bis auf etwa 5—6 unter anaeroben Bedingungen (vgl. darüber auch Chambers, Cohen, Pollak). Wichtig ist nun, daß das Potential auch beim Absterben von Zellen in Abhängigkeit vom Sauerstoffgehalt der Umgebung in kontinuierlicher Weise absinkt. Das spricht dafür, worauf besonders auch Ries hinweist, daß für das r_H bestimmte Substanzen verantwortlich zu machen sind und nicht, wie im Falle des p_H außerdem noch sehr labile, an das lebende Protoplasma gebundene physikalische Gleichgewichtssytseme. Wurmser schließlich nimmt an, daß das Potential der Ascorbinsäure den in lebenden Zellen gefundenen Werten vielfach sehr nahe kommt und er faßt die Ascorbinsäure als wesentlichen Regulator des Redoxpotentials der Zellen auf. Nun zeigten aber die histochemischen Untersuchungsergebnisse, daß das Vitamin C nicht dauernd in jeder Zelle vorkommt, sondern eben offenbar nur in bestimmten Leistungsphasen gebraucht wird. Gerade dieser Umstand schließt auch die zunächst naheliegende Einschaltung der Ascorbinsäure in den Hauptweg der Zellatmung aus, was auch von v. Szent Györgyi betont wurde.

Auf Grund meiner eigenen Untersuchungen glaube ich annehmen zu dürfen, daß dann, wenn die Zelle zu Syntheseleistungen in erhöhte Tätigkeit tritt, die Oxydations-Reduktionslage des Grundplasmas in bestimmter Richtung durch den Ascorbinsäureeinstrom verändert wird, und zwar so, daß die zu synthetisierenden Produkte vor der Verbrennung geschützt werden. Denn die erhöhte Zellarbeit bringt zwangsläufig gesteigerte Oxydationen mit sich, da diese ja die Quelle der Energiegewinnung darstellen. Ob sich dabei dieser Oxydationsschutz auch auf das Grundplasma selbst ausdehnt, ist nicht zu sagen. Das Fehlen feinerer cytologischer Veränderungen skorbutischer Zellen, außer ihrer Unfähigkeit bestimmte Substanzen aufzubauen, spricht eher gegen diese letztere Annahme.

Eine gewisse Stütze für diese zunächst als Arbeitshypothese zu wertende Auffassung der Ascorbinsäurebedeutung erbrachte die Untersuchung der Beziehungen zelleigener proteolytischer Fermente zum Vitamin C. Bekanntlich bilden solche Fermente sowohl die neutrophilen Granulocyten, wie die Histiocyten. Ihre Verdauungstätigkeit läßt sich leicht an phagocytiertem Material nachweisen. v. Euler hatte in vitro gefunden, daß proteolytische Fermente vom Typus des Kathepsins durch Ascorbinsäure aktiviert werden können. Wie bereits angeführt wurde, läßt sich in Histiocyten, die Fibrin oder Zelltrümmer verdauen,

regelmäßig Vitamin C nachweisen. Dies trifft aber nicht zu für die Granulocyten, die die gleiche Tätigkeit ausüben. Wie ist dieser Unterschied nun erklärbar? Von chemischer Seite wurde bekanntlich gezeigt (Waldschmidt-Leitz zit. nach Schneider-Widmann), daß die in den Zellen lagernden inaktiven proteolytischen Fermente durch eine Glutathionverbindung aktiviert werden. Diese Glutathionverbindung aber ist sauerstofflabil und kann erst bei sinkender Sauerstoffspannung im Protoplasma bestehen bleiben, wodurch bei den Granulocyten eine zwangsläufige Kopplung von Aufhören der Zellatmung und voller fermentativer Wirksamkeit zustande kommt. Die histobiologischen Beobachtungen stimmen damit überein. Als Träger der proteolytischen Fermente werden in den Granulocyten die Granulationen aufgefaßt und im Dunkelfeld läßt sich in der Tat beobachten, daß beim Zelltod sich die Granula auflösen und damit die volle fermentative Leistung beginnt (Wallgreen). Die Granulocyten stellen demnach ein »Zerfallsorgan« dar, das seine volle biologische Leistung erst mit dem Zelltod erfüllt, weil mit sinkender Atemtätigkeit der Fermentaktivator beständig wird und in Tätigkeit tritt. Demgegenüber erfüllt der Histiocyt seine fermentative Arbeit bei voller Lebenstätigkeit. Man sieht Histiocyten durch enorme Beladung mit Zelltrümmern zu riesigen Zellgebilden heranwachsen, fermentative Tätigkeit und Zelltod sind hier keineswegs gesetzmäßig miteinander verknüpft. Aus Farbstoffspeicherungsversuchen ist bekannt, daß Zellen des reticulo-endothelialen Systems und Histiocyten sich wieder weitgehendst ihrer phagocytierten Substanzen entledigen und ihr ursprüngliches normales Aussehen wiedergewinnen können. Die für den Histiocyten charakteristische Vitamin-C-Beladung während der Verdauungsarbeit scheint hier, trotz Fortbestehen der Zellatmung, das Zustandekommen des sauerstofflabilen Aktivators zu garantieren. Es ist durchaus vorstellbar, daß die stattfindende massive Vitamin-C-Aufladung die Oxydations-Reduktionslage des Grundplasmas so ändert, daß die für den unstabilen Aktivator notwendigen Bedingungen geschaffen werden.

Leider liegen Untersuchungen über das Vorkommen der Ascorbinsäure einerseits und dem Redoxpotential der Zelle andererseits noch gar nicht vor, da durchweg entweder nur das Vitamin C oder nur der r_{H}-Wert bestimmt wurde, nie aber beides zusammen an derselben Zelle untersucht wurde. Gerade derartige Untersuchungen aber wären geeignet, eine endgültige Klärung der Bedeutung der Vitamin-C-Beladung der Zelle während der Syntheseleistungen herbeizuführen. Die Ergebnisse der in vorstehenden Angaben erbrachten Zusammenhänge zwischen

Vitamin-C-Aufladung der Zelle und Protoplasmaleistung seien nun abschließend zusammenfassend wie folgt, formuliert:

Das Vitamin C ist keineswegs in seiner histochemisch nachweisbaren Form ein allgemeiner Dauerbestandteil des Protoplasmas. Schon daraus läßt sich schließen, daß das Vitamin C mit besonderen Protoplasmaleistungen verknüpft ist, nicht aber in kontinuierlich zu jedem Zeitpunkt gegebene Zellfunktionen eingreift. Vielmehr tritt Vitamin-C-Beladung dann ein, wenn im Protoplasma sich gesteigerte Arbeitsvorgänge abspielen, denen irgendwelche Stoffsynthesen zugrunde liegen. Diese Anschauung wird durch die Tatsache gestützt, daß eine Reihe der Beobachtung zugänglicher Substanzen von der Skorbutzelle gar nicht oder nur in vermindertem Ausmaß produziert werden können. Die Ascorbinsäure scheint dabei die Oxydations-Reduktionslage des Grundplasmas so einzustellen, daß trotz der bei der gesteigerten Arbeit erhöhten Energieproduktion, die ja durch oxydativen Abbau zustande kommt, auf engstem Raume daneben sich Aufbauvorgänge abspielen können. Dabei ist das Vitamin C offenbar für eine sehr große Anzahl von Organen für den Ablauf einer geregelten Stoffsynthese erforderlich, ohne deshalb generell jegliche Stoffsynthese im Organismus an die Anwesenheit von Ascorbinsäure knüpfen zu wollen. Die Einstellung der Oxydations-Reduktionslage der Zelle auf den für Synthesevorgänge notwendigen Wert wäre demnach die eigentliche biologische Bedeutung der Ascorbinsäure. Ob dabei aber das Redoxpotential des gesamten Hyaloplasmas verändert wird, erscheint fraglich, vielmehr ist es durchaus möglich, daß in dieser Hinsicht Felderungen im Protoplasma vorliegen. Ausdrücklich sei aber in diesem Zusammenhange nochmals darauf verwiesen, daß nicht an den beschriebenen »Vitamin-C-Granula« selbst sich derartige Oxydations-Reduktionsvorgänge abspielen – sie stellen »blockierte« Depots dar — sondern das chemische Reaktionsfeld der Zelle stellt das Hyalo- oder Grundplasma dar.

Über Beziehungen des Vitamin C zum zellulären Abwehrapparat.

Die in den vorstehenden Abschnitten über den Vitamin-C-Stoffwechsel der Zelle entwickelten Vorstellungen besitzen eine über den Rahmen der Vitaminforschung hinausgehende Bedeutung, da sie als Grundlage für eine neue histophysiologische Arbeitsmethode verwertet werden können. Aus der Vitamin-C-Beladung von Zellen im Bereiche bestimmter Histosysteme lassen sich nunmehr Rückschlüsse auf die Art der Zellfunktion und den Einsatz bestimmter Zellelemente ziehen. Im

folgenden soll nun über einige Untersuchungsbefunde am zellulären Abwehrapparat des Organismus im Gefolge von Infekten und Intoxikationen berichtet werden, sie sowohl im Hinblick auf die Frage der Vitamin-C-Bedeutung von Interesse sind, gleichzeitig aber die Verwendung der histochemischen Vitamin-C-Untersuchung als Arbeitsmethode in dem eben genannten Sinne zeigen.

Die in großer Zahl bei den verschiedensten Krankheiten vorgenommenen Bestimmungen der Vitamin-C-Bilanz durch den sogenannten Belastungstest ließen vermuten, daß bei einigen Infektionskrankheiten ein besonders intensiver Aufbrauch der Ascorbinsäure er-

Abb. 19. Meerschweinchen-Pneumonie. Vitamin-C-beladene Zellen im Alveoleninhalt.

folgt. Naturgemäß aber konnten diese Bilanzbestimmungen bzw. der Nachweis im Gefolge von Erkrankungen zustande kommender Vitamin-C-Defizite nichts über den Ort des Verbrauches aussagen.

a) Pneumonie.

Im Vordergrund des Interesses stand dabei die Pneumonie, besonders deshalb, weil von verschiedenen Seiten (Gander, Niederberger, Hochwald) die reichliche Zufuhr von Vitamin C als begünstigend für den Heilverlauf der Pneumonie empfohlen wurde. In gemeinsamen Untersuchungen mit Matzner konnte ich nun zeigen, daß der Ascorbinsäureverbrauch dabei in dem bei der Pneumonie ja bisweilen ein sehr großes Ausmaß erreichenden Entzündungsfeld selbst erfolgt. Bei der experimentellen Pneumokokkeninfektion des Meerschweinchens ergab sich, daß schon etwa 4 Stunden nach der Infektion

in den vom Infekt betroffenen Lungenpartien eine massenhafte Mobilisation von Alveolarphagocyten erfolgt, die sämtlich Vitamin-C-Beladung aufweisen. Die Alveolarphagocyten entstehen durch Abrundung und Ablösung aus den seßhaften Alveolarepithelien. Charakteristischerweise zeigt die ruhende Alveolarepithelzelle keine Vitamin-C-Beladung, sie zeigt gleichfalls kein, worauf schon hingewiesen wurde, Speicherungsvermögen für saure Vitalfarbstoffe, während die aktivierte Zelle diese Fähigkeit besitzt. Auch die bereits im normalen Lungengewebe in geringer Anzahl vorhandenen aktiven Alveolarphagocyten zeigen bereits Vitamin-C-Beladung. Sie stellen den ortsständigen Abwehrapparat der dauernden Schädlichkeiten ausgesetzten respiratorischen Oberfläche des Lungengewebes dar. Mit fortschreitender Infektion erfährt die Zahl der vitamin-C-beladenen Alveolarphagocyten eine ausgiebige Vermehrung, so daß am 2. und 3. Tage nach der Infektion zahlreiche Alveolen völlig mit derartigen vitamin-C-beladenen Zellen vollgepfropft sind (Abb. 19). Da die Alveolarphagocyten von den gleichfalls im aktivierten Zustande vitamin-C-beladenen Monocyten und echten Histiocyten nicht mehr unterscheidbar sind, ist wohl anzunehmen, daß bei diesen späteren Stadien der Pneumonieentwicklung (2. und 3. Tag) auch derartige Zellelemente an der Zusammensetzung des cellulären Exsudats sich beteiligen. Die nähere mikroskopische Analyse ergibt nun, daß alle diese Zellen mehr oder weniger reichlich mit phagocytiertem Material beladen sind: Zelltrümmer, Leukocyten u. dgl. (Abb. 20). Die zu späterem Zeitpunkt in das Exsudat übertretenden Leukocyten zeigen dagegen keine Vitamin-C-Beladung. Fibrinstreifen, erkenntlich an ihrer fädigen Natur, sind häufig mit vitamin-C-beladenen Exsudatzellen, die sich tief in das Innere derselben einnagen, besetzt. Bei der Darlegung der Vitamin-C-Funktion im vorausgehenden Abschnitt wurde schon über den sehr wahrscheinlichen Zusammenhang der Vitamin-C-Beladung mit der für die Tätigkeit der Abwehrzellen wichtigen Fermentbereitung berichtet und die Nichtbeladung der neutrophilen Granulocyten, die später das Feld beherrschen, zu erklären versucht. Bei der dichten Vitamin-C-Aufladung, die aus der Abbildung gut zu ersehen ist und bei der Größe, die das von solchen Zellen durchsetzte Entzündungsfeld einnimmt, wird der Vitamin-C-Verbrauch bei der Pneumonie leicht verständlich, wenn man die Kleinheit der normalerweise reichlich vitamin-C-führenden Organe in Rechnung setzt. Die Entstehung eines großen Vitamin-C-Defizits bei der Pneumonie wird um so mehr erklärbar, als die spontane Vitamin-C-Zufuhr von außen beim akuten Infekt zumeist aussetzt. Es muß aber

schon hier betont werden, daß eine Mehrbeladung der Exsudatzellen durch über die Sättigung hinausgehende Zufuhr von Vitamin C nicht beobachtbar ist. Auf Grund des in den vorliegenden Abschnitten gewonnenen Einblickes in die Wirkungsweise des C-Vitamins erscheint eine Leistungssteigerung von Zellen durch überschießende Ascorbinsäurezufuhr als völlig ausgeschlossen. So sehr auf Grund der eben mit-

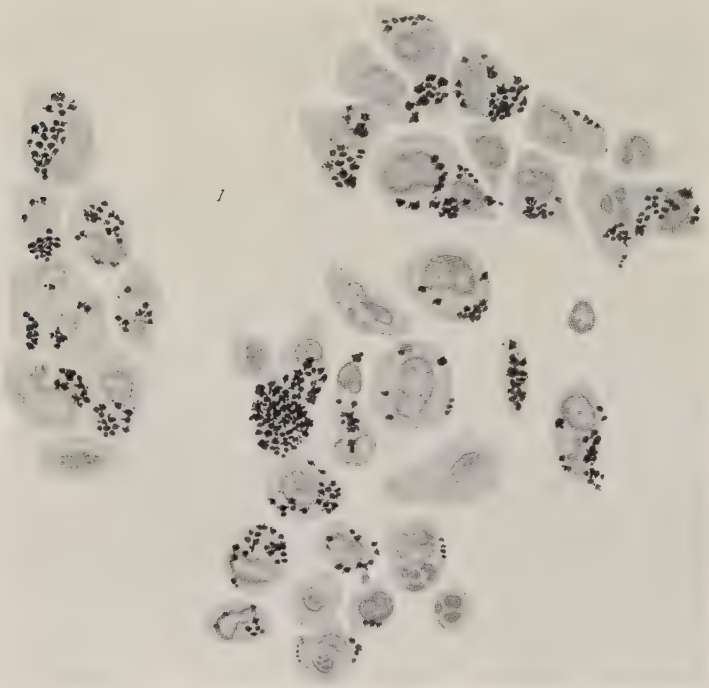


Abb. 20. Meerschweinchenpneumonie. Inhalt dreier benachbarter Alveolen. Septen nicht gezeichnet. Vitamin-C-Gehalt von Alveolarphygocyten und histiocytären Zellen. Phagocytierte Einschlüsse, Leukocyten zeigen keine Vitamin-C-Beladung.

geteilten Vitamin-C-Verteilung im pneumonischen Herd auf die Notwendigkeit der Vitamin-C-Zufuhr als Arbeitsstoff der Zelle für wichtige Plasmafunktionen geschlossen werden darf, so wenig darf man die Ascorbinsäurezufuhr als Heilfaktor auffassen. Sie kann niemals auslösend für Zelleistungen sein, genau so wenig, wie etwa die Atmungsgröße und damit die Leistung eines Organs dadurch geändert werden kann, daß der Organismus in sauerstoffreiches Milieu gebracht wird.

b) Tuberkulose.

Auch bei der Tuberkulose ergaben Bilanzbestimmungen von klinischer Seite ein erhebliches Defizit (Hasselbach). Auch hier ergab

die histochemische Vitamin-C-Untersuchung, daß im Tuberkel selbst Vitamin-C-Verbrauch erfolgt. Dies ließ sich besonders klar bei Kaninchen nachweisen, die nach dem Vorgehen von Bieling und Schwartz zunächst durch intratesticuläre Vorinjektion von Tuberkelbazillen sensibilisiert wurden und nach 3 Wochen eine intravenöse Reinfektion erhielten. Es zeigte sich dabei, daß die Lymphocyten des Tuberkels frei von Vitamin C sind, die Epitheloidzellen dagegen massive Beladung aufweisen. Die Abb. 21 gibt dieses Verhalten der Epitheloidzellen an einem offenbar noch ganz frischen Tuberkel der Nebennierenrinde

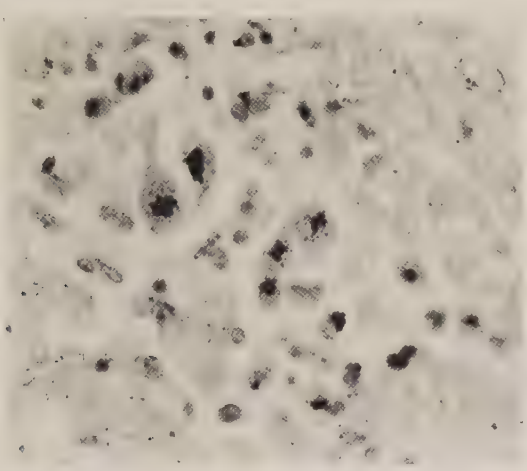
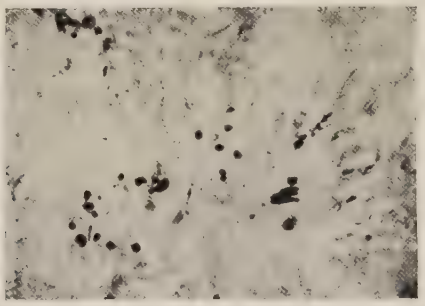


Abb. 21. Tuberkel in der Nebennierenrinde des Kaninchens. Vitamin-C-Emission an den Epitheloidzellen. Etwa 17 Tage nach intravenöser Reinfektion. In der Umgebung schwach beladene Nebennierenrindenzellen.

wieder, der erst aus wenigen Zellen besteht. Die zentral liegenden Epitheloidzellen weisen in besonders klarer Art das Bild der Vitamin-C-Emission vom Golgi-Apparat auf und sind erst von wenigen Lymphocyten umgeben. Durch gleichzeitige Carbolfuchsinfärbung ließ sich am selben Präparat nachweisen, daß die vitamin-C-beladenen Epitheloidzellen Tuberkelbazillen enthalten. Die Abb. 22a zeigt an einer für photographische Zwecke geeigneten Stelle neben den Vitamin-C-Granula die charakteristischen Tuberkelstäbchen. Das Präparat ist der klareren Wiedergabe halber keiner Kern- und Plasmafärbung unterzogen worden. Damit dürfte wohl der klare Nachweis eines wesentlichen »Betriebsstoffes« für die mit der Phagocytose und etwaigen Vernichtung der Tuberkelbazillen betrauten Zellen erbracht sein. Vermutlich handelt es sich wohl auch hier wiederum um ein Eingreifen des Vitamin C in die

endocellulären fermentativen Vorgänge. Auf die Vorstellungen, die Scholz über direkte Beziehungen der Ascorbinsäure zu Fermenten, die in der Lage sind, die Wachshülle des Tuberkelbazillus aufzulösen, entwickelte, sei hier nur verwiesen, da sie vorwiegend auf spekulativen Er-



a

b

Abb. 22a und 22b. a) Zentrum eines Lungentuberkels, Kaninchen. Vitamin-C-Reaktion und Tuberkelbazillendarstellung. Sonst ungefärbt. Neben den Vitamin-C-Granula die Tuberkelbazillen. Zellkonturen nachgezeichnet. b) Zwei einzele Epitheloidzellen mit Tuberkelbazillen und Vitamin-C-Granula.

wägungen beruhen und noch kein ausreichendes Tatsachenmaterial als Grundlage besitzen. Die von Bergel vertretene Meinung, die Lymphocyten würden mit Hilfe fettspaltender Fermente die Vernichtung von Tuberkelbazillen einleiten, begegnet heute einer gewissen Skepsis, da die Beweise über tatsächliches Vorkommen von Lipasen in Lymphocyten neuerdings in Zweifel gezogen wurden (Andreasen). So kann eine Entscheidung darüber, welcher Art die fermentative Leistung der

Epitheloidzellen im einzelnen ist, heute noch nicht getroffen werden. Welches Ausmaß die Ascorbinsäurebeladung des Tuberkelzentrums bei älteren Tuberkeln erreicht, davon geben die Abb. 23 und 24 ein eindringliches Bild. Auch hier sei nochmals darauf verwiesen, daß im Lymphocytenwall sich dagegen nicht eine Spur histochemisch faßbarer Ascorbinsäure nachweisen ließ. Das Verhalten der Ascorbinsäure läßt den Schluß zu, daß offenbar im Innern des Tuberkels ganz andere Stoffwechselverhältnisse herrschen, wie im Lymphocytenwall und dessen

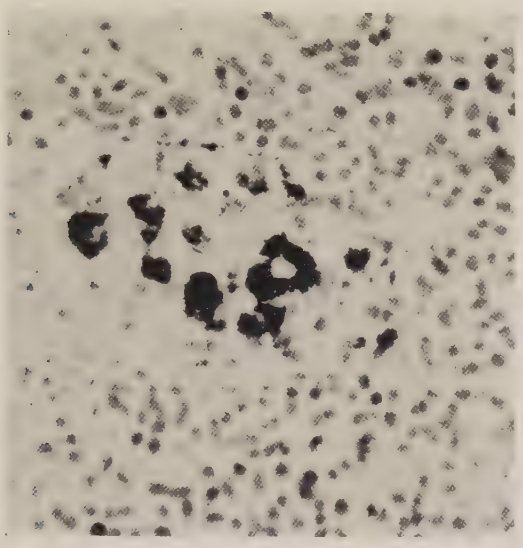


Abb. 23. Massive Vitamin-C-Beladung im Zentrum eines größeren Lungentuberkels. Kaninchen. Lymphocytenwall unbeladen.

Umgebung. Seit den Untersuchungen von Pfaff und Herold ist ja bekannt, daß trotz der Gefäßlosigkeit des Tuberkels ein reger Stofftransport nach dem Zentrum hin möglich ist, der sich fluorescenzmikroskopisch nachweisen läßt. Es ist zu vermuten, daß durch die Anhäufung der Ascorbinsäure im zentralen Bereich des Tuberkels ganz bestimmte Potentialverhältnisse zustande kommen, die offenbar für dort erfolgende fermentative Umsetzungen das erforderliche Milieu schaffen. Leider ist eine Bestimmung des Redoxpotentials der einzelnen Zonen des Tuberkels noch nicht befriedigend geglückt. Es findet sich aber doch bereits ein Hinweis in dem Schrifttum, daß die einzelnen Schichten ein verschiedenes Verhalten gegenüber Redoxindikatoren besitzen, wie z. B. gegenüber Methylenblau (Linden). Dies ist wohl

im Sinne gewisser Potentialverschiedenheiten in den einzelnen Tuberkelzonen aufzufassen. Interessanterweise ergeben sich in dieser Hinsicht ganz ähnliche Verhältnisse beim Lymphfollikel, dessen Keimzentrum dann, wenn es als sogenanntes »Reaktionszentrum« bei der Toxinabwehr in Aktion tritt, gleichfalls von Ascorbinsäure beladenen Zellen erfüllt ist, die wiederum von einem vitamin-C-freien Lymphocytenwall umgeben sind.

Außer im tuberkulösen Herd selbst findet sich bei der Tuberkulose weiterhin Vitamin-C-Beladung in Elementen des reticulo-endothelialen

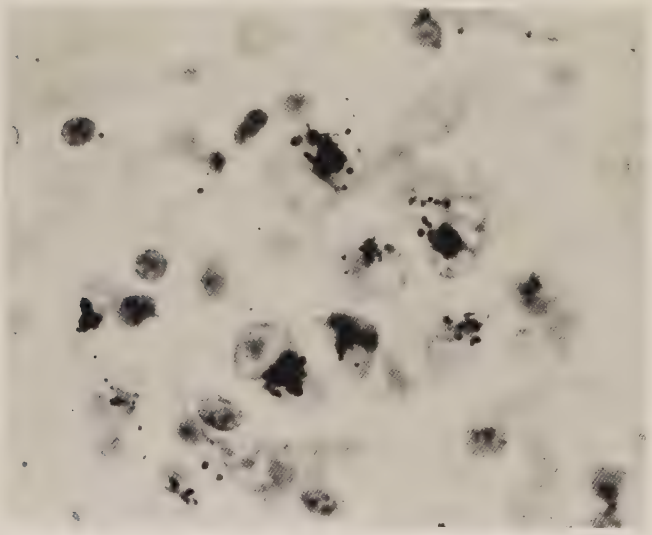


Abb. 24. Zentrum eines Lungentuberkels. Kaninchen. Immersionvergrößerung. Vitamin-C-Lagerung am GOLGI-Apparat. Teilweise auch Emission erkennbar.

Systems, und zwar vor allem in der Milz. Diese Vorgänge treten aber charakteristischerweise bei der chronisch verlaufenden Infektion normergischer Tiere wesentlich stärker zutage, als bei vorausgehender Sensibilisierung. Besonders in der Milz findet sich in solchen Fällen eine enorme Vermehrung von histocytären Elementen im Bereiche der Milzsinus. Die Abb. 25 veranschaulicht die außerordentlich starke Ascorbinsäurebeladung dieser Zellelemente. Wieweit diesen Erscheinungen Bedeutung zukommt im Sinne einer allgemeinen Abwehrfunktion der Milz läßt sich zur Zeit noch nicht restlos übersehen. Wir können aber zusammenfassend sagen, daß die Ascorbinsäure sowohl als Betriebsstoff der Epitheloidzellen, wie für die Arbeitsleistung reticulo-endothe-

lialer Elemente der Milz für die Tuberkuloseabwehr im Organismus von Bedeutung ist.

c) Diphtherietoxinvergiftung.

Die Diphtherietoxinvergiftung bot Gelegenheit, das zum cellulären Abwehrapparat des Organismus hinzuzurechnende lymphatische System einer funktionellen Analyse mittels der histochemischen Vitamin-C-Reaktion zu unterziehen (Unt. gem. mit Schudy). Bekanntlich hat Hellmann durch zahlreiche Versuche dargetan, daß der Lymphfollikel im Mittelpunkt der Infektabwehr steht. Das Keimzentrum, oder viel-

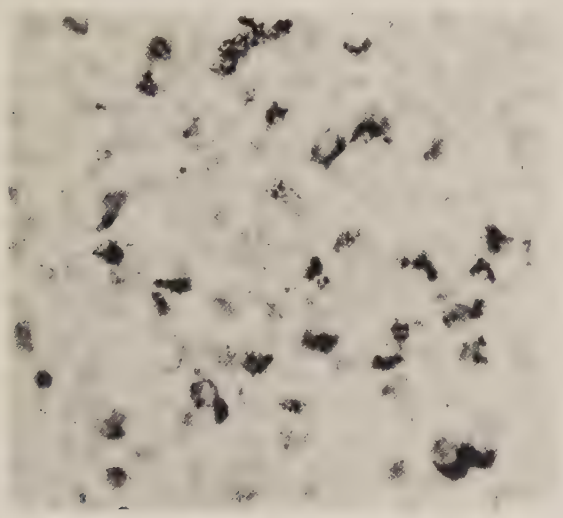


Abb. 25. Milz eines mit Tuberkulose infizierten normergischen Meerschweinchens. Reticulo-endotheliale Elemente mit massiver Vitamin-C-Beladung in der Sinusgegend. Immersionsvergrößerung.

mehr nach seiner Bezeichnung, das »Reaktionszentrum« entsteht als Ausdruck der Abwehrreaktion gegenüber antigen wirkenden Stoffen. Glimstedt gelang der Versuch, Meerschweinchen unter völlig sterilen Verhältnissen aufzuziehen und konnte dabei zeigen, daß die Anlage von Keimzentren dabei fast durchweg unterblieb. Ob daneben doch noch Lymphocytenproduktion mit die Aufgabe des Keimzentrums ist, erscheint gegenüber der genannten prinzipiell wichtigen Feststellung in diesem Zusammenhange von untergeordneter Bedeutung.

Von klinischer Seite her ist andererseits bekannt, daß auch bei der Diphtherie ein erhebliches Vitamin-C-Defizit auftritt, ja von Gagyi ging sogar so weit, die Diphtherie als toxische C-Avitaminose zu bezeichnen, vor allem auf Grund der an der Nebenniere zu beobachtenden Ver-

änderungen. Ehe nun über die mit Hilfe der Vitamin-C-Reaktion erhobenen Befunde berichtet wird, sei kurz das Normalbild des lymphatischen Gewebes nach Anwendung der Vitamin-C-Reaktion vorangestellt. Im Lymphknoten finden sich im wesentlichen nur die Reticulumzellen der Lymphsinus in spärlicher Beladung. Die Abb. 26 zeigt die im reticulären Verbande liegenden Sinuszellen. Sie enthalten in der Golgi-Zone in mäßigem Ausmaß Vitamin-C-Granula. Die Lymphocyten selbst sind normalerweise völlig unbeladen, desgleichen auch die Keimzentren. Nur vereinzelt finden sich in den Keimzentren Zellen, die Vitamin-C-Granula enthalten. Regelmäßig lassen sie alsdann phago-

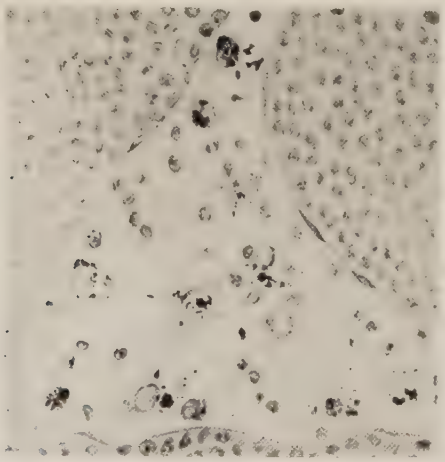


Abb. 26. Sinus aus normalem Lymphknoten vom Meerschweinchen. Vitamin-C-Beladung der in reticulärem Verbande liegenden Sinuszellen.

cytierte Zelltrümmer in ihrem Innern erkennen. Für die Milz gilt das gleiche Verhalten. Besonderer Erwähnung bedarf noch der Thymus. Auch dort zeigt das reticuläre Grundgewebe, das aber hier epithelialer Abkunft ist, Vitamin-C-Beladung. Die Hassalschen Körperchen zeigen normalerweise nur selten und durchweg sehr spärliche Vitamin-C-Granula.

Dieses Bild erfährt nun sehr charakteristische Veränderungen bei mit Diphtherietoxin vergifteten Meerschweinchen, allerdings nur dann, wenn während der Toxinwirkung für ausreichende Vitamin-C-Zufuhr gesorgt wird. Die in unseren Versuchen verwendete Toxindosis betrug eine eben tödliche Menge, wobei der Tod zwischen der 40. und 48. Stunde nach der Toxinverabreichung eintrat. Die Reaktionszentren, die bekanntermaßen eine erhebliche Vergrößerung erfahren, sind von zum

Teil enorm großen Zellen erfüllt, deren Plasmaleib dicht erfüllt von phagocytierten Kerntrümmern ist, den ehemaligen sogenannten tingiblen Körperchen Flemmings. Zwischen den phagocytierten Kernbröckeln finden sich reichlich Vitamin-C-Granula. Die Abb. 27 gibt eine derartige

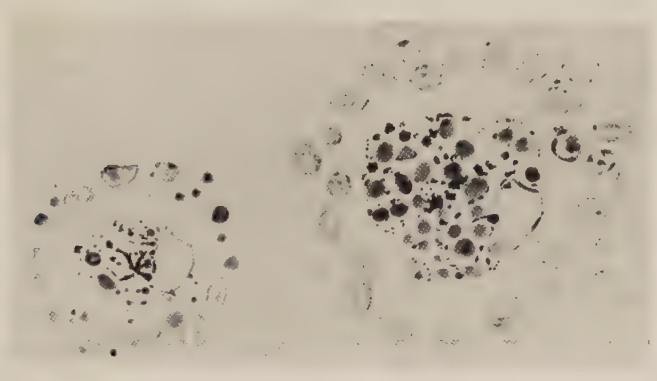


Abb. 27. Riesenphagocyt mit zahlreichen phagocytierten »tingiblen« Körperchen und Vitamin-C-Beladung am Rande des Reaktionszentrums eines Milzfollikels. Diphtherie-Toxinvergiftung. Meerschweinchen.

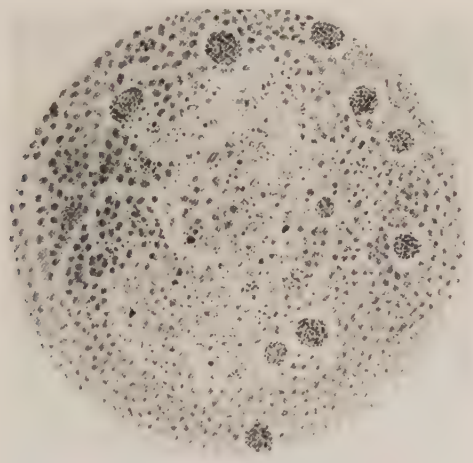


Abb. 28. Reaktionszentrum und Lymphocytenwall eines Lymphfollikels. Diphtherie-Toxinvergiftung. Meerschweinchen.

Riesenzelle isoliert wieder, während auf der Abb. 28 das Gesamtbild eines unter Toxinwirkung stehenden Lymphfollikels dargestellt ist. Vorwiegend die im Reaktionszentrum randständigen Riesenzellen weisen die stärkste Belastung auf. Die zentral gelegenen Phagocyten zeigen dagegen wesentlich schwächere Beladung, aber auch die phagocytierten

Kerntrümmer sind dort bereits größtenteils weitgehend zerfallen und abgeblaßt. Es handelt sich bei dem Vorgang um Chromatolyse. An gut fixierten und vor allem lebensfrisch eingelegten Präparaten ist die tropfenförmige Auflösung der phagocytierten Kerntrümmer gut erkennbar. Dabei scheint der Vorgang zentral im Reaktionszentrum zu beginnen und allmählich nach der Peripherie fortzuschreiten, wobei teilweise ein weitgehender Aufbrauch des Lymphocytenwalls erfolgt. Auf die Verarmung der Lymphfollikel an Lymphocyten im Gefolge der Diphtherietoxinvergiftung wies bereits Jeckeln hin. Die Bedeutung der Vitamin-C-Aufladung der großen Phagocyten entspricht wiederum ihrer endocellulären Verdauungsarbeit. Mehrere Autoren vertreten nun die Meinung, daß den Lymphocyten giftbindende Fähigkeiten zukommen (v. Albertini, Jeckeln). Es ist daher durchaus vorstellbar, daß die durch Toxinbindung zugrunde gehenden Lymphocyten, die dann von histiocytären Zellen phagocytiert werden, durch die intracellulär erfolgende Verdauung endgültig unschädlich gemacht werden. Der Vorgang der Lymphocytenzerstörung ist aber durchaus nicht auf das Reaktionszentrum allein beschränkt, denn man sieht auch im lymphatischen Grundgewebe massenhaft derartige Riesenphagocyten auftreten, die durch ihre Vitamin-C-Beladung sich deutlich aus dem dichten und zellreichen Gewebe abheben. Die Bildung der Antikörper soll nach der Vorstellungen von Hellmann im Reaktionszentrum erfolgen. In der Tat konnte Österlind in sehr umfangreichen quantitativen Untersuchungen über Größe und Zahl von Reaktionszentren im lymphatischen Gewebe im Gefolge von Immunisierungsvorgängen eine weitgehende Parallelität der Ausbildung der Reaktionszentren und der Höhe des Antitoxintiters im Blut feststellen. Die der Antitoxinbildung offenbar im Reaktionszentrum zugrundeliegenden Vorgänge treten in voller Ausprägung erst nach längerer Zeit und nur nach Verabreichung nicht zu starker Toxinmengen auf (Österlind). Untersuchungen über etwaige Vitamin-C-Beteiligung an den sich dabei im Reaktionszentrum abspielenden cellulären Vorgängen sind noch nicht angestellt, da es zunächst nur darum zu tun war, die Reaktion des lymphatischen Gewebes auf hohe Toxindosen zu prüfen.

Im Thymus lassen sich ganz analoge Vorgänge wie in Lymphknoten und Milz beobachten, auch hier entstehen aus den epithelialen Reticulumzellen überall Lymphocyten vernichtende Riesenphagocyten, die in entsprechender Weise wie in Milz und Lymphknoten mit Vitamin C beladen sind. Auch in Hassalschen Körperchen finden sich charakteristische Veränderungen. Wie schon von früheren Untersuchern bekannt

ist, treten bei infektiösen und toxischen Einflüssen Vermehrungen, Vergrößerungen und degenerative Veränderungen der Hassalschen Körperchen auf (Takeuchi, Worms, Klotz, Hammar). Hammar hat insbesondere an Thymen diphtherietoxinvergifteter Tiere eine eindeutige Vermehrung der Zahl der Hassalschen Körperchen gefunden. Er glaubt daher, daß die Hassalschen Körperchen unter dem Einfluß »gewisser endogen und exogen entstandener Stoffe gebildet werden«. Auf Grund seiner Befunde und den sonstigen Ergebnissen der physiologischen Thymusforschung vermutet Hammar weiter, daß die Hassalschen Körperchen »in irgendeiner Weise morphologische Exponenten einer von dem Organ vertretenen Schutzfunktion seien«. Nachdem man früher häufig die Hassalschen Körper als Träger der Thymusfunktion aufgefaßt hatte, dann aber lange Zeit sie lediglich als bedeutungslose Degenerationsprodukte einschätzte, hat somit Hammar neuerdings den Hassalschen Körperchen eine Rolle im funktionellen Geschehen des Thymus zugesprochen. Wie sich gleich zeigen wird, sprechen die histochemischen Vitamin-C-Untersuchungen ganz im Sinne dieser Hammarschen Auffassung. Die Hassalschen Körperchen fanden sich bei unseren Versuchstieren in der Regel ganz enorm vergrößert und dabei dicht erfüllt von eingeschlossenen Zelltrümmern. Da die Oxydasereaktion an diesen eingeschlossenen Zelltrümmern positiv ausfällt, muß es sich hierbei wohl größtenteils um Zellen myeloischer Abkunft handeln. Während nun in dem normalen Thymus die Hassalschen Körperchen abgesehen von ihrer Kleinheit nur eine geringe Vitamin-C-Beladung aufweisen, sind sie bei den diphtherietoxinvergifteten Tieren häufig geradezu übersät von Vitamin-C-Granula. Noch bemerkenswerter aber als diese Erscheinung ist das Verhalten der Hassalschen Körperchen und auch der Thymusreticulumzellen bei einer Versuchsserie mit Tieren, die vitamin-C-arm, aber nicht gänzlich vitamin-C-frei ernährt wurden. Die Diphtherietoxinvergiftung bewirkte bei diesen Tieren in allen Organen einen vollkommenen Schwund der histochemisch nachweisbaren Vitamin-C-Vorräte mit Ausnahme des Thymus. Dort fand sich sowohl in den Hassalschen Körperchen, wie in den Reticulumzellen noch reichlich Vitamin C. Das spricht dafür, daß der Thymus seine Vitamin-C-Vorräte außerordentlich zäh festhält bzw. dort noch Vitamin-C-Konzentration eintritt, wenn andere Organe entleert werden. Sparmaßnahmen des Organismus setzen gewöhnlich zunächst an weniger wichtigen Stellen ein, um jene Organe, die die knapp werdende Substanz am dringendsten brauchen, am längsten versorgen zu können. Das Vorfinden von Vitamin C im Thymus zu einem Zeitpunkt, in dem die

Vorräte in den übrigen Organen schon aufgebraucht sind, darf daher als Zeichen dafür gewertet werden, daß hier sich wesentliche Vorgänge abspielen. Der Schluß, diese Vorgänge in Zusammenhang mit der Toxinabwehr zu bringen, liegt daher nahe, besonders, wenn man zu diesen Ergebnissen das Resultat der numerischen Untersuchungen Hammars über die Vermehrung der Hassalschen Körperchen im Gefolge der Diphtherie in Beziehung setzt.

Die eben dargelegten Untersuchungsergebnisse lassen keinen Zweifel darüber, daß die Ascorbinsäure auch für die Funktion des lymphatischen Gewebes als Betriebsstoff in Frage kommt. In Übereinstimmung damit steht der auch titrimetrisch festgestellte relative hohe Ascorbinsäuregehalt lymphatischer Organe (Giroud und Leblond, Hammar, v. Euler).

Die Betrachtungen über die Beziehungen des Vitamin C zum cellulären Abwehrapparat seien noch kurz ergänzt durch die Beobachtungen, die sich an der diphtherietoxinvergifteten Nebenniere erheben ließen. Bekanntlich weist die Nebenniere im Gefolge der Diphtherie eine Reihe sinnfälliger Veränderungen auf, die durch die entsprechende Toxinvergiftung experimentell reproduzierbar sind. Bezüglich der Auswirkung der Diphtherietoxinvergiftung auf den Vitamin-C-Gehalt der Nebennierenrinde liegen eine Reihe gleichlautender Untersuchungen bereits vor, die sämtlich eine Verminderung der Vitamin-C-Vorräte ergaben (v. Gagyi, Thaddea und Lotze). Histochemisch erweist sich die Nebennierenrinde bereits 24 Stunden nach erfolgter Toxinvergiftung so gut wie vollständig vitamin-C-frei. Nur in vereinzelten Fällen konnte in der äußersten Schicht der Zona fasciculata noch spärliches Vitamin-C-Vorkommen nachgewiesen werden. Auch die histochemische Sulfhydrilreaktion fällt fast völlig negativ aus. Da weiterhin bekanntlich auch die Lipoide teilweise schwinden, zeigt die Nebenniere damit das Bild einer weitgehenden Entspeicherung fast aller histochemisch faßbarer Substanzen.

Interessanterweise ergibt nun die histochemische Untersuchung des Corpus luteums bei der Diphtherietoxinvergiftung ein ganz analoges Bild wie die Nebennierenrinde. Die normalerweise reichlich vitamin-C-haltigen Zellen sind vollständig leer, das Parenchym durch Blutungen gewöhnlich in viel stärkerem Ausmaße geschädigt wie in der Nebennierenrinde. Die Parallelität der Reaktion der Nebennierenrindenzelle und Corpus-luteum-Zelle im Gefolge der Diphtherietoxinvergiftung läßt naturgemäß an die nahen chemischen Beziehungen denken, die Corticosteron und Progesteron zueinander aufweisen.

Nach den über Pneumonie, Tuberkulose und Diphtherie gemachten kurzen Angaben kann die Bedeutung des Vitamins C als Arbeitsstoff des cellulären Abwehrapparates des Organismus nicht bestritten werden. Aus dem Vitamin-C-Vorkommen in den verschiedensten Zellelementen dieses Abwehrsystems darf wohl dieser Charakter der Ascorbinsäure als Betriebsstoff für bestimmte Arbeitsleistungen erschlossen werden, dagegen sind hieraus noch keinerlei Schlüsse möglich, wie weit die physiologische Leistungsfähigkeit dieses Zellapparates tatsächlich mit der Ascorbinsäureanwesenheit verknüpft ist. Ein Effekt einer überreichlichen Vitamin-C-Zufuhr ist nach dem in den früheren Abschnitten gezeigten feinen Regulationsmechanismus des Vitamin-C-Stoffwechsels der Zelle von vornherein abzulehnen, denn das überschüssig zugeführte Vitamin C gelangt gar nicht an den Wirkungsort, nämlich das Protoplasma. Gerade das Beispiel der Diphtherietoxinvergiftung gibt nun besonders klar die Möglichkeit zu prüfen, wie weit über den Sättigungsgrad zugeführte Ascorbinsäuremengen als etwaiger »Heilfaktor« wirken können, da die Vergiftung exakt dosierbar ist und daher ständig wirklich brauchbare Vergleichsfälle reproduziert werden können. Das Ergebnis derartiger Untersuchungen an umfangreichem Tiermaterial läßt sich kurz zusammenfassen. Die Vitamin-C-Zufuhr hat zunächst nicht den geringsten erkennbaren Einfluß auf die Diphtherieintoxikation hinsichtlich der Überlebensdauer der Versuchstiere, ein Ergebnis, über das auch Ebel und Mauner, Schmidt und andere Autoren bereits berichteten. Aber auch die viel objektiver beurteilbaren morphologischen Veränderungen, die sich an der Nebennierenrinde und im lymphatischen Gewebe abspielen, sind in keiner Weise durch Vitamin-C-Gaben hintanzuhalten. Selbst höchste Ascorbinsäuredosen - 50 mg zweistündlich verabreicht — waren ohne jeglichen morphologischen Effekt, obwohl Thaddea und Lotze berichteten, durch alleinige Vitamin-C-Zufuhr bei gleicher Toxindosierung sowohl in den Nebennieren, wie im lymphatischen Gewebe fast alle charakteristischen Veränderungen verhindert zu haben. (Einschaltend sei hier bemerkt, daß auch die kombinierte Verabreichung von Nebennierenrindenhormon und Vitamin C ohne jeglichen Einfluß sowohl auf den Ablauf der Vergiftung, wie auf die — im übrigen hierbei ganz besonders zutage tretenden — morphologischen Veränderungen in Milz und Nebenniere war, wiederum in striktem Gegensatz zu Angaben von Thaddea und Lotze.) Besonders instruktiv aber war das Verhalten von Skorbuttieren, die mit Diphtherietoxin behandelt wurden. Obwohl die Tiere nach dreiwöchentlicher Skorbutkost schon sehr geschwächt waren, überlebten sie die Toxin-

vergiftung genau so lange wie normal ernährte oder reichlich mit Vitamin C versorgte Kontrolltiere. Das zeigt wohl klar, daß die Bedeutung des »Betriebsstoffes« Vitamin C für den cellulären Abwehrapparat keinesfalls überschätzt werden darf, sondern, daß die Ascorbinsäure eben nur mit einen von vielen anderen Arbeitsstoffen des Abwehrapparates darstellt.

Schrifttum.

Im Schriftenverzeichnis wurden nur die Arbeiten aufgeführt, die ausdrücklich im Text zitiert werden. Bezüglich weiterer Schriftenangaben verweise ich auf meine früheren Arbeiten über das Vitamin-C-Problem.

v. Albertini: Schweiz. med. Wschr. **33**, 745 (1932). — **Andreasen:** Verh. anat. Ges. **1938**. — **Bersin, Jusatz** und **Höster:** Klin. Wschr. **1935** II, 1419. — **Bieling** und **Schwartz:** Klin. Wschr. **1933**, Nr. 11. — **Bourne:** Anat. Rec. **66** (1936). — **Chambers, Cohen** und **Pollak:** Protoplasma **17** (1932). — **Demole, Cahen** und **Pfalz:** Klin. Wschr. **1935** I, 966. — **v. Euler:** Ergebn. Vitamin- u. Hormonforsch. **1** (1938). — **Fischer:** Z. mikrosk.-anat. Forsch. **43**, 342 (1938). — **v. Gagyi:** Klin. Wschr. **1936** I, 191. — **Gander:** Studien über den Vitamin-C-Stoffwechsel im Militär. Als Manuskript gedruckt 1937. — **Gander** und **Niederberger:** Münch. med. Wschr. **1936**, 2074. — **Gickelhorn:** Protoplasma **2** (1927). — Ergebn. Physiol. **31** (1931). — **Giroud:** Acta Sci. et ind. **435** (1936). — Ergebn. Vitamin- u. Hormonforsch. **1** (1938). — **Giroud** und **Leblond:** Bull. Histol. appl. **11** (1934). — Bull. Soc. Chim. biol. **1936**. — Anat. Rec. **68**, 113 (1937). — **Glimstedt:** Acta pathol. Scand. **30** (1936). — **Hammar:** Die normal-morphologische Thymusforschung. J. A. Barth, Leipzig 1936. — Z. mikrosk.-anat. Forsch. **9**, 68 (1927). — **Hammarsten:** Biochem. Z. **144** (1924). — **Hasselbach:** Dtsch. med. Wschr. **1**, 924 (1936). — **Hanke:** Dtsch. Z. Chir. **245**, 530 (1933). — **Hellmann:** Beitr. pathol. Anat. **68**, 333 (1921). — **Hertwig:** Die lebende Masse. In: Möllendorff, Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen **1**. Springer 1929. — **Hirt:** Verh. anat. Ges. **1938**. — **Hochwald:** Wien. Arch. inn. Med. **1936**. — **Jacobs:** Erg. Biol. **2** (1925). — **Jasswoin:** Z. Zellforsch. **2** (1925). — **Jeckeln:** Beitr. pathol. Anat. **90**, 244 (1932). — **Jessey-Korpassy:** Zbl. Chir. **90**, 2836 (1934). — **Klein:** Anat. Anz. **87** (1938). — **Kopsch:** Enzyklopädie für Mikro-Technik, 3. Aufl. 1926. — **Lauber, Naefziger** und **Bersin:** Klin. Wschr. **38** (1937). — **Leblond:** C. r. Soc. Biol. Paris **1927**, 208. — **Ley:** Arch. Gynäk. **164** (1937). — **Linden:** Zit. nach Kollath, Klin. Wschr. **1936**. — **Ludford:** Proc. R. Soc. London **104** (1930). — **v. Möllendorff:** Arch. mikr. Anat. **90** (1918). — Ergebn. Physiol. **18** (1920). — Z. Zellforsch. **2** (1925). — Handbuch der Biologie des Menschen und der Tiere **2**. Jena 1925. — Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden, Abt. V, Teil 2/I. Berlin 1928. — **Morawitz:** Zit. nach Stepp, Kühnau und Schröder: Die Vitamine und ihre klinische Anwendung. Enke, Stuttgart 1936. — **Nassonov:** Z. Zellforsch. **3** (1926); **11** (1930). — Protoplasma **15** (1932). — **Neuweiler:** Arch. Gynäk. **130** (1936). — **Okkels:** Skand. Arch. Physiol. **69** (1934). — Act. Sci. et ind. Paris **1936**. — **Otto:** Klin. Wschr. **2**, 1511 (1936). — **Österlind:** Acta pathol. Scand. **34** (1938). — **Pfaff** und **Herold:** Grundlagen einer

neuen Therapieforschung der Tuberkulose. Thieme, Leipzig **1937**. — **Pfuhl:** Z. Zellforsch. **26**, 565 (1937). — Z. mikrosk.-anat. Forsch. **41**, 569 (1937). — **Philippe** und **Baratte:** C. R.. Soc. Biol. **128**, 592 (1938). — **Policard** und **Ferrand:** C. R. Soc. Biol. Paris **1936**. — **Ries:** Grundriß der Histophysiologie. Akademische Verlagsgesellschaft 1938. — Publ. Staz. Zool. Napoli **16** (1937). — Z. Zellforsch. **22** (1935). — **Seemann:** Zur Histobiologie der Lungenalveole. Jena, Fischer 1931. — **Seki:** Z. Zellforsch. **19** (1933). — Fol. anat. Japon **11** (1933). — **Shimamura:** Fol. pharmacol. Japon. **30**, 25 (1938). — **Szent-Györgyi:** Bull. Soc. Chin. Biol. **15** (1933). — **Schilowzew:** Dtsch. Z. Chir. **209**, 320 (1938). — **Schmidt:** Dtsch. med. Wschr. **1937** II, 1003. — **Scholz:** Dtsch. med. Wschr. **1938** I, 374. — **Schröder:** Klin. Wschr. **1934** I, 553. — **Schudy, G.:** Verh. anat. Ges. **1938**. — **Takeuchi:** Verh. Jap. pathol. Ges. **6**, 17 (1916). — Jap. med. World **10** (1919). — **Terbrüggen** und **Fischbach:** Virchows Arch. **301** (1938). — **Thaddea** und **Lotze:** Virchows Arch. **300**, 685 (1937). — **Tonutti:** Klin. Wschr. **1936/1937**. — **Tonutti** und **Plate:** Arch. Gynäk. **1937**. — Vortrag. In: Z. Geburtsh. Gynäkol. **1937**. — Z. klin. Med. **132** (1937). — Z. mikrosk.-anat. Forsch. **42** (1937). — **Tonutti** und **Matzner:** Z. mikrosk.-anat. Forsch. **42** (1937). — Klin. Wschr. **1938**, Nr. 2. — Protoplasma **31** (1938). — Beitr. pathol. Anat. **101** (1938). — Verh. anat. Ges. **1938**. — **Tonutti** und **Wallraff:** Klin. Wschr. **1938**, Nr. 24. — Z. mikrosk.-anat. Forsch. **44**, 532 (1938). — Klin. Wschr. **1939**, 535. — Beitr. pathol. Anat. **103**, 78 (1939). — **Timm:** Habilitationsschrift der medizinischen Fakultät der Universität Leipzig 1932. — **Waldschmidt** und **Leitz:** Zt. nach Schneider-Widmann, Der Eiter im Bilde der Entzündung. Enke 1936, S. 114. — **Wallgren:** Ebenda S. 32. — **Worms** und **Klotz:** Ann. anat. pathol. **11**, 1 (1934). — Ann. méd. **36**, 17 (1934). — **Wurmser:** C. R. Soc. Biol. Paris **1934**.

Printed in Germany.

Neuerscheinung!

Mikrophotographie

Von

Dr. Gerhard Stade und **Dr. Herbert Staude**

Berlin Berlin

1939, VIII, 202 Seiten mit 164 Abbildungen im Text

Preis RM 11.80, Lw. RM 13.20

Die Mikrophotographie, die früher ausschließlich Domäne der reinen Wissenschaft war, ist heute zu einem wertvollen Hilfsmittel der Praxis geworden. In jedem chemischen Betrieb, in Krankenhäusern, bei zoologischen und botanischen Untersuchungen, bei Materialprüfungen usw. sind Mikrophotographien unerläßliche Hilfsmittel geworden. Das vorliegende Buch, dessen Stoff von den Verfassern auf Grund jahrelanger Erfahrungen kritisch gesichtet ist, soll dem Praktiker die Grundlagen der Mikroskopie und Mikrophotographie in kurzer Form vermitteln und ihm alte und neue, sowie bisher noch nicht bekannt gewordene Verfahren näherbringen.

AUS DEM INHALT:

Die Gesetze der optischen Abbildung im Mikroskop. — Die mikroskopischen Anordnungen. — Spezielle mikrophotographische Anordnungen. — Mikrophotographische Geräte. — Die photographische Aufnahme.

Akademische Verlagsgesellschaft m.b.H., Leipzig

Soeben erschien in neubearbeiteter 2. Auflage:

Kurzes Lehrbuch der Enzymologie

Von Prof. Dr. Theodor Bersin, Marburg

VIII, 183 Seiten mit 32 Abbildungen
Preis RM. 11.—, Leinen RM. 12.80

Aus dem Inhalt

1. Teil: **Allgemeine Eigenschaften der Enzyme.** 1. Das Stoffliche: Die kolloide Natur der Enzyme / Der feinere Aufbau der Enzyme / Die Enzyme als Eiweißkörper. — 2. Das Präparative: Darstellungsverfahren / Chromatographie / Untersuchungsmethodik / Enzymreaktionen in schwerem Wasser. — 3. Das Dynamische: Quantenmechanische Deutung von Enzymkatalysen / Kinetik / Die optische Spezifität der Enzyme / Die Temperaturabhängigkeit der Enzymwirkung / Strahlungseinwirkung / Die Wirkung sehr hoher Drucke auf Enzyme / Effektoren der Enzymwirkung / Enzyme als Redoxsysteme. — 4. Das Biologische: Über die Bildung der Enzyme / Verteilung von Enzymen im Zell-Protoplasma / Enzymatische Histochemie / Biologische Methoden zur Untersuchung der Fermentdynamik / Immunologische Eigenschaft von Enzymen.

2. Teil: **Die Enzyme als chemische Individuen.** 1. Die Hydrolasen: Esterasen / Die Carbohydrasen / Amidasen / Proteasen. — 2. Kohlensäureanhydrase. — 3. Carboxylase. — 4. Die Redoxasen.

3. Teil: **Die Bedeutung der Enzyme für Atmung, Ernährung und Stoffwechsel.** 1. Bakterien, Hefe und Pilze: Enzymchemische Differenzierung von Hefen und Bakterien / Anoxydative Gärung / Oxydative Gärung / Die enzymatische Bindung des molekularen Stickstoffs / Schwefelbakterien. – 2. Phanerogamen: Die Assimilation der Kohlensäure / Samenkeimung / Enzyme als genotypische Merkmale von Pflanzen / Vitamine und Enzyme / Tabakbereitung. – 3. Tiere und Mensch: Atmung / Verdauung / Glykogenolyse / Neoplasmen / Eiweißspaltende Enzyme / Vererbung u. Enzymaktivität.

Akademische Verlagsgesellschaft m. b. H., Leipzig

Printed in Germany